CHEMIE DER ENZYME

VON

HANS EULER,
PROFESSOR DER CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STOCKHOLM.

ZWEITE, NACH SCHWEDISCHEN VORLESUNGEN VOLLSTÄNDIG UMGEARBEITETE AUFLAGE.

II. TEIL.

SPEZIELLE CHEMIE DER ENZYME.

1. ABSCHNITT:

DIE HYDROLYSIERENDEN ENZYME DER ESTER, KOHLE-HYDRATE UND GLUKOSIDE.

MIT 44 TEXTFIGUREN.

MÜNCHEN UND WIESBADEN.
VERLAG VON J. F. BERGMANN.
1922.

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz A.G., Würzburg.

Vorwort zum II. Teil.

Bei der Bearbeitung der speziellen Enzymchemie war es meine Absicht, alle Einzeltatsachen und Beziehungen mitzuteilen, welche den mit Enzymen Arbeitenden, dem Forscher auf diesem Sondergebiet, dem Biologen, dem Mediziner und dem in der biochemischen Technik stehenden Praktiker von Nutzen sein können.

Das reichhaltige Material habe ich in zwei Hälften geteilt. Im vorliegenden ersten Abschnitt sind die hydrolysierenden Enzyme der Ester, Kohlehydrate und Glukoside behandelt; im bald folgenden zweiten Abschnitt werden die übrigen Enzyme zusammengefasst.

Der Leser wird finden, dass die Substrate und ihre chemischen Eigenschaften und Umsetzungen ausführlicher erwähnt sind, als dies in früheren Darstellungen dieses Gebietes der Fall war. Es entspricht dies meiner Überzeugung, dass der Ausbau einer möglichst breiten und vertieften konstitutionschemischen Grundlage für die gesunde Entwicklung der Enzymologie von allergrösster Bedeutung ist. Ohne eine solche Grundlage geht viel Arbeit ohne bleibenden Nutzen verloren.

Es liegt in der Natur der Sache, dass die Reaktionskinetik einen wesentlichen Teil unserer Wissenschaft ausmacht; aber die Ergebnisse der theoretischen Chemie können auf die enzymatischen Vorgänge erst dann sachgemäss angewandt werden, wenn die Art der stofflichen Veränderungen und der dabei beteiligten Komponenten erkannt ist. Wo dies der Fall war, ist die auf die Ergebnisse der physikalischen Chemie gestützte exakte Behandlung von Reaktionsgeschwindigkeiten und Gleichgewichten besonders in den letzten Jahren fruchtbar geworden.

Durch die Anwendung dieser quantitativen Methodik auf den lebenden Organismus wird die Enzymchemie zur Entwicklung der Biologie und besonders der Medizin noch wesentlicher beitragen können, als dies bisher geschehen ist. Systematische Bearbeitungen der einzelnen Organe und Lebensprozesse, wie sie mir als Ziel vorschweben, liegen bis jetzt nur vereinzelt vor; ich habe die Darstellung dieses schliesslich wichtigsten Teils der Enzymologie

noch zurückgestellt in der Hoffnung, in den nächsten Jahren mit grösseren Hilfsmitteln einige der jetzt vorhandenen Lücken füllen und dann dieses Buch mit einem dritten Teil: „Über enzymchemische Vorgänge im Organismus“ abschliessen zu können.

Für diesen dritten Teil bilden die beiden vorhergehenden gewissermassen die Voraussetzungen.

In vorliegendem Band, wo Tausende von Einzeltatsachen referiert werden mussten, habe ich mir öfters von Fachgenossen Rat erholen müssen, und so habe ich vielen Kollegen, besonders den Herren Barthel, Freudenberg, O. Hammarsten, Neuberg, Pringsheim, Thunberg und Willstätter bestens zu danken.

An alle Leser richte ich die Bitte, durch Hinweise auf Versehen und Lücken an der Vervollkommnung dieses Buches mitwirken zu wollen.

Schliesslich möchte ich nicht unterlassen, die Unterstützung meiner Assistenten K. Josephson und K. Myrbäck dankbar zu erwähnen.

Stockholm, im August 1922.

Der Verfasser.

Inhalt des 1. Abschnittes.

1. Abschnitt.

Die hydrolysierenden Enzyme
der
Ester, Kohlehydrate und Glukoside

Übersicht.

Grundzüge der Einteilung.

Bei der Einteilung des reichen Versuchsmateriales, über welches die Enzymchemie jetzt schon verfügt, sind dem Verfasser folgende Gesichtspunkte massgebend gewesen:

Was bis jetzt an allgemeinen Gesetzen, Beziehungen und Regelmässigkeiten bekannt gewesen ist oder bei der Durcharbeitung gefunden werden konnte, ist im ersten Band dieses Buches zusammengestellt worden. Jener Band sollte den Ansatz zu einer theoretischen Enzymologie bilden, welche das feste Gerüst unserer Wissenschaft werden muss. Eine moderne Naturwissenschaft strebt zur Theorie nicht allein um das Kausalitätsbedürfnis des Forschers zu befriedigen, sondern auch der nunmehr verbreiteten Einsicht folgend, dass die Theorie, indem sie die vielen, verschlungenen Einzelbeziehungen entwirrt und klarlegt, auch für den Praktiker das zweckmässigste, Zeit und Energie sparende Mittel zur Beherrschung der Tatsachen bildet.

Indessen ist das theoretische Lehrgebäude der Enzymologie erst im Werden. Zahlreiche Tatsachen stehen noch vereinzelt, und unter diesen gewiss auch solche, welche für den Forscher, für den Arzt und den Techniker nicht minder wertvoll sind als andere, welche bereits ihren festen Platz in der Theorie gefunden haben. Die Geschichte zeigt uns, dass für die Entwickelung einer Wissenschaft oft gerade diejenigen Tatsachen von Wert sind, welche mit den geläufigen allgemeinen Anschauungen nicht in Zusammenhang oder in Übereinstimmung gebracht werden können. In diesem Sinne sind im vorliegenden Band alle Tatsachen zusammengestellt worden, welche dazu beitragen können, ein richtiges und vollständiges Bild von den einzelnen Enzymen zu liefern.

In der Überzeugung, dass wir gar nicht oft genug auf die chemischen Grundlagen unserer Wissenschaft zurückgehen können, ist bei jedem Enzym einleitend das Substrat und der chemische Vorgang bei seiner Verwandlung behandelt worden.

Über das Vorkommen der Enzyme werden nur insoweit Angaben gemacht, als solche für die Chemie der Enzyme von Wert sind, in erster

Linie für die Darstellung von Enzympräparaten. Keineswegs ist also hinsichtlich der Angaben über das Vorkommen eine Vollständigkeit angestrebt worden; man findet diesbezügliche, sehr dankenswerte Zusammenstellungen in dem bekannten Buch von C. Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen (Leipzig, 4. Aufl. 1913), auf welches auch wegen sonstiger vorwiegend physiologisch interessanter Einzelheiten verwiesen sei.

Durchgehends ist versucht worden wenigstens eine brauchbare Darstellungsmethode für jedes Enzym anzugeben.

Unter den vielen Messungen über die Dynamik der Enzymreaktionen kann natürlich nur ein kleiner Teil wiedergegeben oder ausführlicher referiert werden; dabei sind ohne historische Rücksicht unter den jetzt vorliegenden Versuchsreihen einige zuverlässige und besonders typische Messungen ausgewählt worden.

Auch über den Einfluss der Temperatur findet man bei jedem Enzym eine Auswahl der genauesten Angaben.

Hervorgehoben wurde die Bedeutung der chemischen Aktivatoren und Paralysatoren, der Salze und besonders der Azidität, deren Ausserachtlassung früher so viele Widersprüche in der enzymologischen Literatur verursacht hat.

Schliesslich findet man bei jedem Enzym die wichtigsten Methoden zur Messung seiner Wirksamkeit zusammengestellt und besprochen.

Nomenklatur.

Bei der bereits grossen und sich rasch vermehrenden Zahl der bekannten Enzymwirkungen ist eine rationelle Nomenklatur notwendig. Nach einem Vorschlag von Duclaux (vgl. Bourquelot, Les ferments solubles, Paris 1896) wird der Name des Enzyms von demjenigen Stoff abgeleitet, auf welchen er wirkt; so z. B. ist Laktase dasjenige Enzym, welches Laktose spaltet. Leider wird von diesem Prinzip noch vielfach abgegangen.

Ist der aus dem Substrat abgeleitete Name nicht eindeutig, so ist nach dem Vorschlag von E. O. von Lippmann[1]) sowohl der Stoff welcher zerlegt wird, als auch das (Haupt)-Produkt der Spaltung zur Namengebung heranzuziehen; z. B. wäre hiernach Amylo-Maltase das Enzym, welches Maltose aus Stärke bildet. Da nun aber dieses Enzym keine Maltase ist, sondern vielmehr zur Klasse der Amylasen gehört, so wäre es wohl zweckmässiger, einen solchen Stoff als Malto-Amylase zu bezeichnen.

Synthetisierende Enzyme sollen nach einem Vorschlag des Verfassers[2]) nach demjenigen Stoff bezeichnet werden, welchen sie bilden, und sie

[1]) von Lippmann, Chem. Ber. 36, 331; 1903 und Chem. Ztg. 38, 81; 1914. — Vergl. auch Buchner und Meisenheimer, Chem. Ber. 38, 621; 1905.

[2]) Euler, H. 74, 13; 1911.

sollen als Katalysatoren von Synthesen durch die Endsilbe „ese" gekennzeichnet werden; demgemäss wäre Phosphatese dasjenige Enzym, welches organische Phosphate (Phosphorsäureester) synthetisiert. Dieser Vorschlag ist aus rein praktischen Gesichtspunkten veranlasst und soll über die Beziehungen von synthetisierenden und hydrolysierenden Enzymen, besonders über die Frage, ob an synthetisierenden und spaltenden Wirkungen bei umkehrbaren Enzymreaktionen ein Enzym oder zwei Enzyme beteiligt sind, nichts aussagen.

Allgemein angenommene Namen, wie Pepsin, Zymase, Trypsin, Erepsin sind um so eher beibehalten worden, als es klar ist, dass hier keine einheitlichen Enzyme vorliegen, sondern Enzymkomplexe, deren Komponenten zum grössten Teil noch nicht so genau definiert sind, dass die Einführung einer rationellen Namengebung schon zweckmässig wäre. Emulsin, Zymase sind Bezeichnungen für gebräuchliche Enzympräparate, welche eine Anzahl verschiedener enzymatischer Stoffe enthalten; wünschenswert ist stets die Angabe der Herkunft, also Bezeichnungen wie Mandelemulsin, Schweinsdarmerepsin, Oberhefenzymase.

Systematik.

Die Grundlagen für die Systematik der Enzyme bilden, da über die Natur der Enzyme selbst sehr wenig bekannt ist, die chemischen Reaktionen, welche sie auslösen. Es ist zu erwarten, dass man einmal die Zusammengehörigkeit, welche sich aus der chemischen Wirksamkeit ergibt, bei der Beschreibung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Enzyme wiederfinden wird.

Eine Aufzählung aller in der Literatur vorkommenden Enzyme, deren Individualität z. T. nicht genügend sichergestellt ist, liegt nicht im Rahmen dieser Arbeit.

Die folgende Zusammenstellung bezweckt, einen allgemeinen Überblick über diejenigen typischen Reaktionen zu geben, an deren Verlauf Enzyme beteiligt sind.

Reaktion	Substrat	Produkte	Enzym
Reaktionen $R \cdot H + HO \cdot R' \rightleftarrows R \cdot R' + H_2O$	**Ester**	Fettsäuren + Alkohole	Esterasen
	Fette	höhere Fettsäuren + Glyzerin	Lipasen
	niedere Ester	niedere Fettsäuren + Alkohole	Butyrasen
	Phosphorsäureester	$R \cdot OH$ + Phosphorsäure	Phosphatasen
	Fruktosediphosphat	Fruktose + Phosphorsäure	(Fruktose-) Phosphatase
	Zymohexose + Phosphat	Fruktosediphosphat	Phosphatese
	Phytin	Inosit + Phosphorsäure	Phytase
	Nukleotide	Nukleosid + Phosphorsäure	Nukleotidasen

Reaktion	Substrat	Produkte	Enzym
Reaktionen $R \cdot H + HO \cdot R' \rightleftarrows R \cdot R' + H_2O$	**Höhere Kohlehydrate**		
	Zellulose	Zellulosedextrine	Zellulase
	Hemizellulosen		Zytase
	Stärke, Glykogen	Maltose, (Dextrine)	Amylasen u. Glykogenasen
	Inulin	Fruktose	Inulinase
	Pektinstoffe	reduz. Zuckerarten	Pektinase
	Glukoside inkl. Polyosen	Hexosen u. Glukosidreste	
	α-Glukoside und α-Galaktoside	α-Glukose, α-Galaktose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	α-Glukosidasen (Maltase, Trehalase u. a.) α-Galaktosidasen
	β-Glukoside	β-Glukose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	β-Glukosidasen (Emulsin)
	β-Galaktoside	β-Galaktose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	β-Galaktosidasen, Laktase
	Fruktoside	Fruktose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	Saccharase
	Nitril-Glukoside	Glukose + Oxynitrile	(Amygdalase)
	Myronsaures K	Glukose + $HKSO_4$ + C_3H_5NCS	Myronase
	Nukleoside	Pentosen + Nukleinbasen	Nukleosidasen
	Carbaminderivate		
	$R \cdot CO \cdot NH \cdot R'$	$R \cdot COOH + H_2N \cdot R'$	Carbamasen, Proteinasen
	Proteine	Albumosen, Peptone	Pepsine; Papain
	Proteine, Albumosen Peptone, Peptide	Peptide, Aminosäuren	Trypsine
	Peptide	Aminosäuren	Peptasen, Erepsin
	Harnstoff	$CO_3(NH_4)_2$	Urease
	Arginin	Harnstoff + Ornithin	Arginase
	Nukleinsäure	Nukleinbasen + Zucker + Phosphorsäure	Nukleasen (Enzymkomplex)
Umkehrbare Alkoholyse	Chlorophyll + C_2H_5OH	Krist. Chlorophyll + Phytol	Chlorophyllase
Umkehrbare Spaltungen	Oxynitrile	Aldehyd + HCN	Nitrilasen
Nicht umkehrbare Spaltungen	Zymohexosen	Äthylalkohol + CO_2	„Zymase" (Enzymkomplex
	Glukose	Milchsäure	Milchsäurebakterien-zymase
	Brenztraubensäure (α-Ketosäuren)	Azetaldehyd + CO_2	Karboxylase
	Milchsäure	Äthylalkohol + CO_2	Laktazidase
	Hydroperoxyd	Molekularer Sauerstoff + H_2O	Katalase
Isomerisationen (Umlagerungen)	Hexosen	isomere Hexosen	Hexasen (Glukase etc.)
Sauerstoffübertragung	Peroxyde	Reduktionsprodukte der Peroxyde + O	Peroxydasen

Reaktion	Substrat	Produkte	Enzym
Oxydationen	Phenole	Chinone	Phenolasen
	Aldehyde	Säuren	Aldehydasen
	Alkohol	Essigsäure	Alkoholoxydase der Essigsäurebakterien
Cannizaro-Reaktion	Aldehyde	Alkohol + Säure	(Cannizaro-Enzym)
Schardinger-Reaktion	Akzeptor (Farbstoff oder Nitrat) + Aldehyd	Leuko-Farbstoff bzw. Nitrit	(Schardinger-Enzym)

Für die Einreihung der „koagulierenden“ Enzyme Pektase, Chymosin und Thrombin in die obige Übersicht fehlen bis jetzt die zuverlässigen chemischen Unterlagen, ebenso für die Systematik der an der Nukleinspaltung beteiligten Enzyme. Die Pektase wird im Anschluss an die Pektinase besprochen, Chymosin und Thrombin im Anschluss an die Proteinasen.

1. Kapitel.

Esterasen.

Die allgemeine Wirkung dieser Enzyme besteht in der Katalyse der Reaktion zwischen Karbonsäure-Estern und ihren Komponenten nach dem Schema:

$$R \cdot COO \cdot R' \rightleftarrows R \cdot COOH + HO \cdot R'.$$

Die Reaktion führt bekanntlich zu definierten Gleichgewichten (Berthelot und Péan de Saint Gilles): an ihr ist die Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes auf chemische Reaktionen zum erstenmal gezeigt worden (Guldberg und Waage, 1867; van't Hoff, 1877).

Die Einstellung des Ester-Gleichgewichts wird bekanntlich auch durch Säuren katalysiert und zwar ziemlich genau proportional der Konzentration der H-Ionen (vergl. Bd. 1, S. 103, 125).

Noch schneller als unter der Einwirkung von dissoziierten Säuren verläuft die Spaltung in Gegenwart von überschüssigen HO-Ionen, und zwar ebenfalls proportional der Konzentration dieser Ionen. Man bezeichnet diese Reaktion als Verseifung. Da durch die katalysierenden, HO-Ionen liefernden Basen die aus den Estern entstehenden Säuren neutralisiert werden, so verläuft die Verseifung, im Gegensatz zur Hydrolyse, vollständig bis zum Verbrauch des Esters oder der Base.

Die verschiedenen Ester werden durch die gleichen Katalysator-Mengen mit sehr verschiedenen Geschwindigkeiten gespalten. Man findet vergleichende Messungen über die Hydrolysen durch HCl bei de Hemptinne und Löwenherz[1]), über Verseifungsgeschwindigkeit bei Reicher[2]). Da der Vergleich mit den bei den enzymatischen Spaltungen gewonnenen Zahlen interessant ist, so setze ich einige Resultate von Löwenherz hierher:

Geschwindigkeitskonstanten k der Spaltung durch 0,1 n · HCl bei 40°.

Ester	$k \cdot 10^4$	Ester	$k \cdot 10^4$
Ameisensaures Äthyl	1100	Essigsaures Methyl	55
Essigsaures Äthyl	57	Essigsaures Äthyl	57
Buttersaures Äthyl	35	Essigsaures Propyl	56
Isobuttersaures Äthyl	34		
Valeriansaures Äthyl	12		
Benzoesaures Methyl	0,3	Essigsaures Phenyl	33

[1]) Löwenherz, Zs f. physik. Chem. 15, 389; 1894.
[2]) Reicher, Lieb. Ann. 228, 257; 1885.

Neutrale Ester mehrwertiger Säuren oder mehrwertiger Alkohole werden stufenweise gespalten, wobei jede Reaktionsstufe ihre besondere Geschwindigkeitskonstante besitzt. (Vergl. Bd. I, S. 129, Stufenweise Reaktionen.)

Glyzerinester höherer Fettsäuren sollen im allgemeinen durch Alkali und durch Lipasen schneller verseift werden als die entsprechenden Äthylester (H. H. Franck).

Eine von Falk und Nelson[1]) sowie später von Hamlin[2]) untersuchte Katalyse durch Aminosäuren bedarf noch weiterer Aufklärung.

Zu einer endgültigen, rationellen Einteilung der Esterasen auf Grund ihrer chemischen Wirksamkeit reicht das vorliegende experimentelle Material noch nicht aus. Dagegen empfiehlt sich eine vorläufige Scheidung in zwei Gruppen:

A. Tierische Esterasen,

B. Pflanzliche Esterasen.

Wir folgen hierin dem Vorgang von W. Connstein, dessen vor 17 Jahren erschienene Monographie „Über fermentative Fettspaltung"[3]) immer noch sehr lesenswert ist.

Bei keiner dieser beiden Gruppen ist eine Einheitlichkeit gewährleistet oder auch nur wahrscheinlich, wie unten näher ausgeführt wird. Beide Gruppen zeigen Unterschiede in der Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Estern. Eine Trennung in

1. Lipasen, welche die eigentlichen Fette und Öle (Triglyzeride der höheren Fettsäuren) spalten,
2. Butyrasen, welche vorzugsweise die Ester niedrigerer Fettsäuren mit ein- oder mehrwertigen Alkoholen angreifen,

liegt bei den pflanzlichen Esterasen nahe, lässt sich aber bei den tierischen Esterasen schwer durchführen. Nach Rona und Bien entfalten im allgemeinen die Butyrasen ihre Wirkung im homogenen System, die Lipasen im heterogenen System, und tatsächlich scheint ein Zusammenhang zwischen Löslichkeit, Dispersitätsgrad und Wirkungsbereich bei den Esterasen zu bestehen.

A. Tierische Esterasen.

Das sicherste Einteilungsprinzip ist gegenwärtig die Azidität der optimalen Wirksamkeit.

Nach der Untersuchung von Davidsohn[4]) besitzt das im Magen vom Säugling vorkommende Enzym ein Wirksamkeitsoptimum bei $p_H = 5-4$, während für Esterasen aus Pankreas, Darm, Blutserum und Frauenmilch ein

[1]) Falk u. Nelson, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 828; 1912.
[2]) Hamlin, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 624; 1913.
[3]) Connstein, Ergebn. d. Physiol, 3, 194; 1904.
[4]) Davidsohn, Biochem. Zs 49, 249; 1913.

Optimum bei $p_H = 7—8,6$ gefunden wurde. Das Magenenzym weicht also von den übrigen, wenigstens in dieser Hinsicht, übrigens auch noch anderweitig, deutlich ab, und es scheint ein Unterschied zwischen diesen und den übrigen Esterasen zu bestehen, welcher an denjenigen zwischen dem proteolytischen Enzym des Magens, dem Pepsin, und dem Trypsin des Pankreas, Darmes und Serums erinnert.

Demgemäss wird zunächst die Magen-Esterase einzeln behandelt.

1. Magen-Esterase.

Die Magenesterase, die im Pawlowschen Magensaft vorkommt, ist zweifellos eine eigentliche Lipase, d. h. sie spaltet Fett[1]). Von grossem Einfluss ist hierbei, wie immer bei Reaktionen im heterogenen System, die Grösse der Oberfläche des Substrates, also hier der Emulsionsgrad des Fettes[2]). Als Substratemulsionen kommen hier in Betracht: Eigelb, Milch, Mandelmilch, Lebertran, Emulsion von Ölen in Seifen. Neben eigentlichen Fetten werden auch die Lipoide, Lezithin, Jekorin und Protagon angegriffen[3]). Ferner ist die Magenesterase wirksam gegenüber Glyzeriden und Alkoholestern niederer Fettsäuren.

Vorkommen. Es kann nunmehr als sichergestellt gelten, dass die Magenlipase in der Sekretion des Magens selbst enthalten ist[4]), dass also der Duodenalsaft höchstens einen Teil des im Magen wirksamen fettspaltenden Enzymes liefert. Die wirksame Magenlipase wird vom Fundusteil abgeschieden (Volhard).

Den Nachweis der Spaltung von Neutralfett im Magen verdankt man Marcet (1858) und Cash (1880).

Auch die Magenschleimhaut enthält Lipase, was Ibrahim und Kopec[5]) beim Fötus nachgewiesen haben. Wirksame Glyzerinextrakte sind mehrfach beschrieben worden. In wässerigen Auszügen hat man Butyrasewirkung nachgewiesen.

Bei Magenkrebs und Achylie soll der Magensaft kein Fettspaltungsvermögen besitzen[6]).

Enzymmaterial und Darstellung. Die interessantesten Versuche sind mit Magensaft angestellt, welcher bekanntlich am besten mit der von

---

[1]) Volhard, Zs klin. Med. 42, 414; 43, 397; 1901. — Stade, Hofm. Beitr. 3, 291; 1902. — Fromme, Hofm. Beitr. 7, 51; 1905. — Zinsser, ebenda 7, 31; 1905.

[2]) Siehe hierzu auch Laqueur, Hofm. Beitr. 8, 281; 1906.

[3] P. Mayer, Biochem. Zs 1, 81; 1906.

[4]) Siehe auch Bickel, Deutsche med. Woch. 32, 1323; 1906. — Falloise, Arch. internat. de Physiol. 3, 396 und 4, 87; 1906. — Heinsheimer, Deutsche med. Woch. 32, 1194; 1906. — London u. Wersilowa, H. 56, 545; 1908. — Dass beim normalen Menschen Duodenalinhalt in den Magen zurückfliesst, betont neuerdings auch O. Gross (Dtsch. Arch. Klin. Med. 132, 121; 1920).

[5]) Ibrahim u. Kopec, Zs Biol. 53, 201; 1906.

[6]) v. Pesthy, Biochem. Zs 34, 147; 1911.

Pawlow[1]) angegebenen Methodik gewonnen wird. (Bd. I, S. 8.) Zu Versuchen, wo es sich darum handelt, kräftige, reproduzierbare Wirkungen zu erhalten, ist jedenfalls die Verwendung von Magensaft derjenigen von Glyzerinextrakten der Magenschleimhaut entschieden vorzuziehen.

Inouye hat mit Glyzerinextrakten von Magenschleimhaut überhaupt keine Wirkungen auf Fettemulsionen erhalten. Etwas erfolgreicher ist Fromme unter Volhards Leitung gewesen. Er hat mit der Schleimhaut von Schweine- und Hundemagen gearbeitet, und zwar mit dem Fundusteil. Man kann entweder die Magenschleimhaut-Trockensubstanz nach Verreiben mit Glyzerin auf Fettemulsion wirken lassen, oder die Verreibung mit verdünntem Alkali vornehmen.

Häufiger ist frische Schleimhaut angewandt worden. Die Schleimhaut wird einige Stunden nach der Schlachtung abgezogen, der Fundus- vom Pylorusteil getrennt. Der Fundusteil wird fein zerhackt und durch Gaze

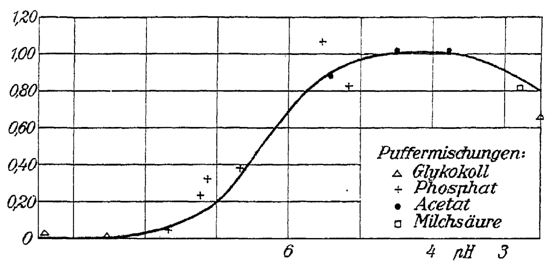


Fig. 1.

koliert. Er wird mit 2 Teilen Glyzerin extrahiert; das Extrakt ist aber erst nach mehrtägigem Stehen wirksam (Fromme).

Aziditätsbedingungen. Über die Säure- und Alkalienempfindlichkeit der Magenlipase hat Volhard (l. c.) die ersten eingehenderen Versuche angestellt. Mit der modernen Methodik von Sörensen und Michaelis hat dann Davidsohn[2]) die Mageneesterase mit der Pankreasesterase und der Serumesterase verglichen. Die Versuche waren an Tributyrin mit der stalagmometrischen Methode von Rona und Michaelis[3]) (vergl. S. 45) ausgeführt. Davidsohn erhielt für Lipase des Magensaftes menschlicher Säuglinge die Aziditätskurve der Figur 1.

Man sieht, dass die Magenlipase ein ziemlich breites Aziditäts-Optimum im Gebiet pH = 5 — 3 besitzt.

Im allgemeinen erinnert die Kurve an die von Sörensen u. Michaelis für Saccharase erhaltene (Bd. I, S. 30).

[1]) Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden, Bergmann, 1898.
[2]) Davidsohn, Biochem. Zs 45, 284; 1912.
[3]) Rona u. Michaelis, Biochem. Zs 31, 345; 1911.

Davidsohn zieht auch aus der obigen Kurve analoge Schlüsse wie Michaelis aus derjenigen für Saccharase: Er fasst dieselbe als Dissoziationsrestkurve auf; indem er die Magenlipase als einen Ampholyten betrachtet, entnimmt er der Kurve den Wert für die Säuredissoziationskonstante $K = 4{,}5 \cdot 10^{-7}$, und schätzt die basische Dissoziationskonstante zu $K = 10^{-12}$.

Nach Davidsohn[1]) und Salge[2]) liegt die Azidität des Säuglingsmagens auf der Höhe der Verdauung durchschnittlich in einem Bereich von pH = 6—4; die Lipase kann also darin gut zur Wirkung kommen.

Umwandlung des Zymogens in das Enzym. Nach Volhard besteht zwischen dem Pepsin und der Lipase des Magens, abgesehen davon, dass beide am besten in saurer Lösung wirken, auch insofern eine Analogie, als beide in den Drüsen als Zymogen vorhanden sein sollen (weshalb auch der Glyzerinextrakt der Schleimhaut zunächst Zymogen enthalte), während sich im Magensaft sowohl Pepsin als Lipase im Enzymstadium befinden. In dieser Weise deutet Volhard die verschiedene Empfindlichkeit der Lipase im Magensaft und des Glyzerinextraktes der Schleimhaut.

Aktivatoren. Bemerkenswert ist, dass Magenesterase im Gegensatz zur Pankreasesterase (siehe S. 16) durch Galle nicht aktiviert wird.

Paralysatoren. NaF hemmt spezifisch Esterasen (Loevenhart u. Pierce), aber nach Davidsohn (Biochem. Zs 45) Magenesterase erheblich weniger als Pankreasesterase; letzterer Forscher fand für die Spaltung von Tributyrin bei einer Konzentration von 1 Tl. NaF in 400 Tln. Wasser, also 0,25 % oder 0,06 n, eine Hemmung von 66 %. Vergl. hierzu die Wirkung auf Pankreasesterase S. 19.

Zeitlicher Verlauf und Dynamik der Fettspaltung durch Magensaft.

Eine grosse Anzahl älterer Versuche verdankt man Volhard und seinem Schüler Stade (l. c.). Stade hat seine Versuche mit Eigelb als Substrat unter Benutzung der Volhardschen Methodik (S. 43) ausgeführt, bei welcher die Menge der abgespaltenen Fettsäure bestimmt wird.

Ob stets die optimale Azidität eingehalten war, lässt sich schwer beurteilen.

Es liegt ein ausgesprochen mikroheterogenes Reaktionssystem und gleichzeitig eine umkehrbare Reaktion vor. Über den erreichbaren enzymatischen Endzustand ist nichts bekannt (vergl. Bd. I, S. 209) und auch über das natürliche Gleichgewicht bei Fetten sind wir wenig unterrichtet. Unter den von Stade gewählten Versuchsbedingungen scheint die Reaktion nicht zu Ende zu verlaufen, wobei möglicherweise auch eine Enzymhemmung durch die Spaltprodukte mitwirkt.

[1]) Davidsohn, Zeitschr. f. Kinderheilk. 2, 420; 1911 und 4, 208; 1912.
[2]) Salge, ebenda 4, 171; 1912.

Dies geht auch aus den Versuchen über den zeitlichen Verlauf der Reaktion hervor (Stade, l. c. S. 305), wie aus folgenden Figuren deutlich wird.

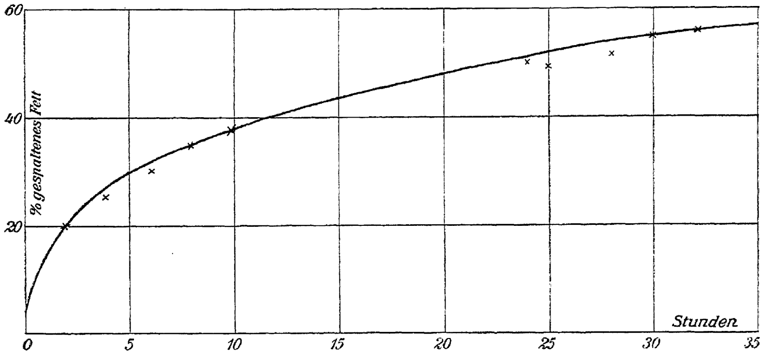


Fig. 2a.

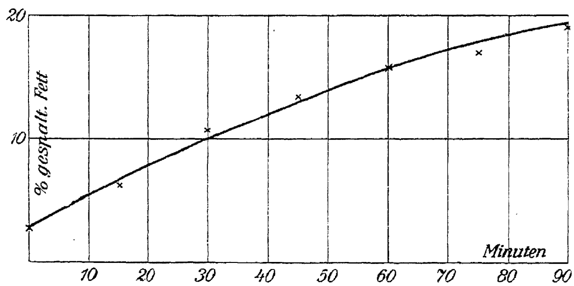


Fig. 2b.

Bei verhältnismässig geringen Fettmengen war die in vier Stunden gebildete Säuremenge direkt proportional der angewandten Fettmenge, wie folgende Tabelle zeigt (Versuchsreihe 12):

Versuchsanordnung			Enzymatisch abgespaltene Fettsäuremenge in %
Eigelblösung ccm	Magensaft ccm	H_2O ccm	x
10,0	5	—	21,2
7,5	5	2,5	22,7
5,0	5	5,0	22,4
1,0	5	9,0	22,5

Bei grösseren Fettmengen wird prozentisch immer weniger Fettsäure abgespalten.

Was den Einfluss der Enzymmenge auf die zu einer gewissen Zeit gespaltene Substratmenge, bzw. auf die zur Erreichung eines gewissen Spaltungs-

grades erforderliche Zeit betrifft, so hat Volhard die Gültigkeit der sog. Schützschen Regel angenommen (Bd. I, S. 124)

$$x = \varkappa \sqrt{E} \qquad \text{bzw.} \qquad x = \varkappa_1 \sqrt{t}$$

(x = umgesetzte Substratmenge, E = angewandte Enzymmenge, t = Zeit).

Die der Versuchsreihe Nr. 15 entnommenen Werte für x der folgenden Tabelle gelten für 24 Stunden und 40°. Die in der letzten Spalte enthaltenen $\varkappa$-Werte zeigen den Grad der Annäherung an die Schützsche Regel.

Versuchsanordnung			Enzymatisch gespaltene Fettsäuremenge in %	$\frac{x}{\sqrt{E}} = \varkappa$
Magensaft E ccm	Eigelb ccm	H_2O ccm	x	
25	100	–	24,5	4,9
16	100	9	19,5	4,9
9	100	16	15,0	5,0
4	100	21	8,5	4,3
1	100	24	4,7	4,7

Bei weitergehender Spaltung stimmt die Regel von Schütz weniger gut mit den in den Figuren 2 wiedergegebenen Zahlen Stades.

Arrhenius[1]) hat die Versuchsreihe 10 nach der von ihm abgeleiteten Formel berechnet.

$$a \ln \frac{a}{a-x} - x = \varkappa P t$$

(a = anfängliche Substratmenge, P = E = Enzymmenge; siehe Bd. I, S. 125 u. ff.)

Stunden	x beobachtet	x berechnet	
2	0,204	0,186	$\varkappa P = 10$
4	0,256	0,257	
6	0,298	0,308	
8	0,353	0,348	
10	0,376	0,383	
25	0,495	0,552	
29	0,515	0,582	
31	0,554	0,596	
35	0,609	0,620	
75	0,775	0,784	

2. Pankreas-Esterase.

Den Nachweis der Fettspaltung durch den Pankreassaft verdankt man Claude Bernard (1856). Ausser Neutralfetten werden auch niedere Ester hydrolysiert; die Frage, ob es sich hierbei um ein und dasselbe Enzym handelt, ist von Terroine[2]) und auch neuerdings von Abderhalden[3]) im bejahenden Sinne beantwortet worden.

[1]) Arrhenius, Immunochemie, Leipzig 1907, S. 82.
[2]) Terroine, Jl de Physiol. et Pathol. gén. 13, 857; 1911.
[3]) Abderhalden u. Weil, Fermentf. 4, 76; 1920.

Morel und Terroine[1]) haben die Angreifbarkeit verschiedener Ester durch Pankreassaft verglichen. Die Spaltungsgeschwindigkeit der Äthylester der ein- und zweibasischen gesättigten Fettsäuren nimmt von der Essigsäure und Malonsäure bis zur Buttersäure bzw. Glutarsäure zu, dann wieder ab, analog hat die Angreifbarkeit der verschiedenen Essigester ihr Maximum beim Butylalkohol. Bei den Triglyzerinestern steigt die Spaltbarkeit vom Triazetin bis zum Trilaurin und fällt dann stark bis zum Tristearin; leichter als dieses wird Triolein gespalten.

Bemerkenswert ist, dass Pankreassaft die Ester normaler Fettsäuren bedeutend schneller spaltet als diejenigen der entsprechenden Isosäuren, was für die Katalyse durch HCl nicht zutrifft (vgl. S. 6). Auch die Ester halogenisierter Fettsäuren werden angegriffen (Terroine. — Abderhalden u. Weil).

Die Angaben von Nencki und Lüdy[2]), dass auch Salizylsäurephenylester (Salol) durch Pankreasenzym zerlegt wird, wurden nicht bestätigt; Chanoz und Doyon[3]) erhielten negative Resultate. Nach Loevenhart[4]) ist zur Spaltung durch Amylsalizylase die Mitwirkung von Gallensalzen erforderlich. Morel und Terroine konnten auf Methylsalizylat und Benzoat nur sehr schwache Wirkung erhalten.

Nach Angabe von Abderhalden und Weil (l. c.) soll das fettspaltende Enzym des Rinderpankreas in seiner Wirkung unspezifisch sein, d. h. unabhängig von der sterischen Isomerie der Fette und somit keine asymmetrische Spaltung razemischer Substrate bewirken. Man vergleiche dieses negative Ergebnis mit den Befunden von Dakin an Leberesterase (Bd. I, S. 256).

Enzymmaterial.

Alle Erfahrungen zeigen, dass für Arbeiten mit Pankreasesterase am geeignetsten der Pankreas-Saft selbst gewählt wird, dessen enzymatische Fähigkeit diejenige von Pankreas-Extrakten sehr erheblich übertrifft. Anscheinend ist der Pankreassaft aller höheren Tiere wirksam, so z. B. von Rind, Schwein und Kaninchen[5]).

Steht Pankreassaft nicht zur Verfügung, so kann mit der Pankreasmazeration gearbeitet werden.

Sowohl die Menge des Pankreassekretes als auch dessen fettspaltende Wirksamkeit wird den Ergebnissen von Pawlow und Walther zufolge durch Fettgenuss, z. B. Einführung von Milch, stark angeregt. Dagegen fand Lombroso[6]) keine Anpassung an die Nahrung.

---

1) Morel u. Terroine, Jl de Physiol. et Pathol. gén. 14, 58; 1912.
2) Lüdy, Arch. f. exp. Pathol. 325, 47; 1889.
3) Chanoz u. Doyon, Jl de Physiol. et Pathol. gén. 2, 695; 1900.
4) Loevenhart, Jl Biol. Chem. 2, 391; 1906. — Magnus, H. 42, 169 u. 48, 376; 1906.
5) Rachford, Jl Physiol. 12, 72; 1891.
6) Ugo Lombroso, Arch. de Fermac. sper. 13, 73; 1912.

Eine brauchbare Vorschrift zur Herstellung eines Pankreasesterasepräparates hat Pottevin[1]) angegeben. Nach dem gleichen Prinzip hat Dietz[2]) gearbeitet.

Pankreasdrüsen vom Schwein werden in einer Fleischhackmaschine fein zerhackt; das Produkt wird so lange mit 96%igem, dann mit absolutem Alkohol behandelt, bis den Gewebsteilen das Wasser entzogen ist. Man zerhackt nochmals mit der Maschine, um einen noch höheren Feinheitsgrad zu erreichen. Der Alkohol wird möglichst vollständig entfernt und der Rückstand im Soxlethschen Extraktionsapparat mit Äther vollständig entfettet. Schliesslich saugt man den Äther ab und trocknet im Luftstrom.

Die so hergestellten Enzympräparate erwiesen sich nach Dietz' Angaben zunächst wenig haltbar, sie wurden mit der Zeit sauer. Um dies zu verhindern, wurden dem Präparat die darin enthaltenen proteolytischen Enzyme mit Wasser entzogen. Man breitet zu diesem Zweck das Präparat auf ein grosses Nutschenfilter aus, übergiesst mit kaltem Wasser und saugt stark ab. Das Auswaschen geschieht so lange, bis das Filtrat mit verdünnter Essigsäure keinen weisslichen Niederschlag mehr gibt. Das Wasser darf mit dem Präparat nicht lange in Berührung sein, weil dieses sonst aufquillt und das Filter verstopft; deswegen gibt man immer nur kleine Portionen Wasser zu und lässt diese erst abfliessen, ehe man neues Wasser aufgiesst. Man trocknet das Präparat mit Alkohol und Äther und macht es durch Sieben homogen.

E. Baur[3]) hackt die frischen, von ihrer Fett- und Bindegewebshülle befreiten Schweinepankreasdrüsen, übergiesst den Brei mit der doppelten Menge Alkohol, lässt 1 Tag stehen, koliert und presst stark. Die trübe Brühe, welche die wirksamen Drüsenzellen enthielt, wird mit Äther gefällt, der Drüsenschlamm wird abgenutscht und mit Äther gewaschen.

Wird das Präparat wirklich trocken gehalten, so behält es seine Wirksamkeit während Monaten unverändert bei.

Zur Gewinnung einer reichlichen Menge Pankreassaft wird dem Fistelhund nach Bayliss und Starling Sekretin eingespritzt. In dieser Weise wurde mit Erfolg von Terroine[4]) sowie von Loevenhart und Souder[5]) verfahren.

Dass die zerkleinerte Pankreasdrüse selbst eine starke fettspaltende Wirkung ausübt, hat schon Nencki 1886 gefunden. Steht Pankreassaft nicht zur Verfügung, so soll zur Fetthydrolyse frischbereitete Mazeration der

[1]) Pottevin, C. r. 137, 378; 1904.
[2]) Dietz, H. 52, 296; 1907.
[3]) E. Baur, Zs angew. Chem. 22, 97 u. 305; 1909.
[4]) Terroine, Biochem. Zs 23, 404; 1910.
[5]) Loevenhart u. Souder, Jl Biol. Chem. 2, 415; 1910.

Pankreasdrüse verwendet werden, wie Connstein empfiehlt und seitdem oft geschehen ist[1]).

Mit einem Presssaft hat v. Pesthy[2]) gute Resultate erzielt; er hackt frisches, von Bindegeweben und Fett befreites Rindspankreas mit der Fleischhackmaschine, zerreibt mit Quarzsand und ein wenig Wasser zu feinem Brei und presst in einer hydraulischen Presse bei 300 Atmosphären ab.

J. H. Long und Fenger[3]) haben versucht den Pankreaspresssaft durch Zentrifugieren in Fraktionen zu zerlegen.

Aus dem frischen Pankreas kann durch Entwässern leicht ein wirksames Trockenpräparat erhalten werden. Aus dem feingehackten Material wird mit Alkohol das Wasser entfernt, hierauf das Fett mit Äther extrahiert. Durch erneute Extraktionen mit Wasser, Alkohol und Äther wird das Präparat verbessert. Das durch Sieben gewonnene feine Pulver liefert mit Wasser verrührt, eine kräftig wirkende Emulsion.

Vielfach ist Pankreatin der Rhenania-Werke in Aachen zur Herstellung von Aufschlämmungen verwendet worden.

Was Glyzerin- oder Wasserextrakte von Pankreasmaterial betrifft, so stimmen nunmehr alle Autoren darin überein, dass dieselben keine Lösungen, sondern Suspensionen des Enzyms sind[4]). Es ist leicht verständlich, dass diese Suspensionen hinsichtlich ihres Dispersitätsgrades in sehr ungleichförmigem Zustand erhalten werden und dass dadurch wiederum ihre Haltbarkeit, Filtrierbarkeit und Empfindlichkeit gegen äussere Einflüsse stark wechselt. Durch Filtrieren werden die Pankreasextrakte mehr oder weniger stark geschwächt[5]).

Glyzerinextrakte werden im allgemeinen durch Verrühren des Pankreasmaterials der zwei- bis fünffachen Menge Glyzerin dargestellt, und zwar benützt man hierzu entweder frischen Pankreas[6])[7])[8])[9])[10]) oder Trockenpräparat[10]). Durch Glyzerinextraktion von Pankreatin-Rhenania hat Engel (siehe S. 21) kräftige Auszüge erhalten.

Glyzerinextrakte von Pankreas enthalten neben Esterase auch tryptische Enzyme, welche, besonders in wässeriger Lösung, die Esterasen zerstören (Terroine[11]), Mellanby and Wooley[12]); Shaw-Mackenzie l. c., Tsuji[13])).

[1]) Abderhalden u. Weil, Fermentforsch. 4, 76; 1920.

[2]) v. Pesthy, Biochem. Zeitschr. 34, 147; 1911.

[3]) Long u. Fenger, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 2213; 1915. — Siehe auch Long, Mary Hull u. H. V. Atkinson, ebenda 2427. — R. A. Nelson u. Long, ebenda 39, 1766; 1917.

[4]) Siehe hierzu auch Berczeller, Biochem. Zs 34, 170; 1911.

[5]) Siehe z. B. Pekelharing, H. 81, 355; 1912.

[6]) Kanitz, H. 46, 482; 1905.

[7]) de Souza, Biochem. Jl 10, 108; 1916.

[8]) Rosenheim u. Shaw-Mackenzie, Jl of Physiol. 40, Proc. VIII, 1910.

[9]) Shaw-Mackenzie, Jl of Physiol. 49, 216; 1915.

[10]) Hamsik, H. 71, 238; 1911.

[11]) Terroine, Biochem. Zs 23, 404; 1910.

[12]) Mellanby u. Wooley, Jl of Physiol. 48, 287; 1914.

[12]) Tsuji, Biochem. Jl 9, 53; 1915.

In Glyzerinlösungen, welche übrigens jahrelang haltbar sind (de Souza, l. c.), ist die tryptische Wirkung durch das Glyzerin gehemmt.

Loevenhart und Peirce[1]) haben Wasserextrakte hergestellt. Sie verrieben 1 g Schweinepankreas mit 75 ccm Wasser und setzten 2 ccm 0,05 n. NaOH zu; die Mischung wurde auf 38° erwärmt; ein Zusatz von 3 ccm Buttersäure erzeugte Fällung in der opaleszenten Flüssigkeit, wobei ihre enzymatische Wirksamkeit vermindert wurde.

Spezifische Aktivatoren (Co-Enzyme).

Es kann nunmehr als festgestellt angesehen werden, dass die Pankreasesterase in einem an sich unwirksamen Zustande sezerniert und erst durch einen besonderen Stoff aktiviert wird (Übergang von Zymogen in Enzym). Dass diese Aktivierung durch die Gallensalze[2]) zustande kommt ist durch die Arbeiten von Magnus[3]), v. Fürth und Schütz[4]), Donath[5]) u. a. bewiesen worden. Die Wirkung der Gallensalze erscheint auch insofern spezifisch, als weder die Magenlipase (Laqueur[6])) noch die Darmlipase (Boldyreff[7])) durch dieselben beeinflusst wird.

Sowohl die synthetische als die spaltende Wirkung der Pankreasesterase wird durch die Gallensalze befördert[8]), während andere Aktivatoren, wie die Salze der alkalischen Erden nur die Spaltung beeinflussen (Pekelharing, l. c.).

Andererseits werden auch andere Pankreasenzyme durch Gallensalze aktiviert: Dass Galle auch einen Aktivator für Trypsin enthält, ist seit langer Zeit bekannt (Rachford 1899; Delezenne; v. Fürth u. Schütz; Wohlgemuth; siehe unter Pankreastrypsin). Auch die Wirkung der Amylase wird durch Gallensalze verstärkt (Wohlgemuth, Biochem. Zs 21; Buglia, Biochem. Zs 25). Es bleibt also noch zu untersuchen, in welchem Grad Gallensalze spezifische Kinasen der Pankreasesterase sind[9]).

Die Frage, welche Bestandteile der Galle die aktivierende Wirkung ausüben, ist vielfach bearbeitet worden. Hewlett[10]) und später Küttner[11]) schrieben dem Lezithin der Galle eine wesentliche Rolle zu; auch Loeven-

---

[1]) Loevenhart u. Peirce, Jl Biol. Chem. 2, 397; 1906.

[2]) Auch mit den Natriumsalzen der synthetischen Glykocholsäure und Taurocholsäure wird der gleiche Effekt erzielt.

[3]) Magnus, H. 48, 373; 1906.

[4]) v. Fürth u. Schütz, Hofm. Beitr. 9, 28; 1906

[5]) Donath, Hofm. Beitr. 10, 390; 1907.

[6]) Laqueur, Hofm. Beitr. 8, 281; 1906.

[7]) Boldyreff, Zbt f. Physiol. 18, 460; 1904. — H. 50, 394; 1907.

[8]) Siehe hierzu Hamsik, H. 65, 232; 1910. — Donath (siehe Anm. 2) hatte negative Ergebnisse erhalten.

[9]) Siehe hierzu auch Temminck Groll, Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. 64, 1157; 1920 und Arch. Néerl. de Physiol. 4, 382; 1920.

[10]) Hewlett, John Hopkins Hosp. Bull. 16, Nr. 166.

[11]) Küttner, H. 50, 472; 1907.

hart und Souder (l. c.) fanden eine starke Beschleunigung durch Lezithin, Indessen zeigen die Versuche von O. v. Fürth und Schütz[1]), dass die Wirkung der Galle nicht auf ihren Lezithingehalt zurückgeführt werden kann.

Terroine (l. c.) hat an Triazetin die Wirkung der Gallensalze auf die Geschwindigkeit der Triazetinspaltung untersucht. Was die Konzentrationsfunktion der Gallensalze betrifft, so ist dieselbe von Loevenhart und Souder. von Donath[2]) und von Terroine untersucht worden. Letzterer Forscher kommt zu folgendem Resultat:

Für die Spaltung der Ester und Triglyzeride von niedrig-molekularen Säuren gibt es, wie auch Loevenhart zeigte, ein Konzentrationsoptimum der Gallensalze, und zwar unter den von Terroine gewählten Bedingungen bei 0,33 %.

Für den Fall der Hydrolyse von Triolein gibt es hingegen kein Optimum der Gallensalzkonzentration. Man beobachtet ein zuerst regelmässiges Zunehmen, das nach und nach abnimmt und dann aufhört, was Donath schon gezeigt hat.

Besondere Sorgfalt hat Terroine auf den Nachweis verwendet, dass die Gallensalze nicht, wie u. a. Bradley[3]) behauptet hat, nur emulgierend wirken. Ihre beschleunigende Wirkung zeigt sich nämlich am besten bei allen an sich schon löslichen Substraten, wie Estern und Triglyzeriden; sie wirken also auch in Fällen, wo die Löslichkeit und die Homogenität der zu spaltenden Mischungen gar nicht beeinflusst werden können.

Einfluss der Azidität.

Nach älteren Angaben von Grützner und von Gamgee soll die Extraktion des Enzyms durch wässeriges Glyzerin befördert werden, wenn dieses mit Soda schwach alkalisch gemacht ist.

Was den Einfluss der Azidität auf die Wirksamkeit des Enzyms betrifft, so liegen nach älteren Arbeiten von Nencki, Rachford und Fokin[4]), neuere Ergebnisse von E. Baur[5]) und von Terroine (l. c.) und mit der modernen Methodik angestellte von H. Davidsohn[6]) vor. Nach denselben liegt das Aziditätsoptimum der Pankreasesterase (Duodenalsaft vom Säugling, bestimmt an Tributyrin mit der stalagmometrischen Methode) bei $3{,}2 \cdot 10^{-9}$, also $pH = 8{,}5$.

Davidsohn berechnet hiernach die Säuredissoziationskonstante der als Ampholyten aufgefassten Pankreasesterase $K_a = 1{,}0 \cdot 10^{-7}$.

---

[1]) v. Fürth u. Schütz, Hofm. Beitr. 9, 28; 1907.

[2]) Donath, Hofm. Beitr. 10, 390; 1908.

[3]) H. C. Bradley, Jl Biol. Chem. 6, 133; 1909.

[4]) Fokin, Revue der Fette und Harze 1904, 244.

[5]) E. Baur, Zs. angew. Chem. 22, 97; 1909. E. Baur hob wohl zuerst die ausschlaggebende Bedeutung der Azidität bzw. Alkalinität auf den Wirkungsgrad der Pankreaslipase scharf hervor.

[6]) Davidsohn, Biochem. Zs 45, 284; 1912 und 49, 249; 1913.

Einfluss der Temperatur.

Auch in dieser Hinsicht hat Terroine Versuche angestellt (l. c. S. 420 u. ff.). Nach diesem Autor verliert Pankreassaft, 10 Minuten lang auf 65° erwärmt, jede lipolytische Kraft. Versucht man aus den Zahlen Terroines die Inaktivierungskonstante (Bd. I, S. 176) zu berechnen, so gelangt man zu einem angenäherten Wert, $k_c = 1 \cdot 10^{-2}$. Ob diese Ergebnisse bei optimaler Azidität gewonnen sind, lässt sich schwer beurteilen. Jedenfalls scheint hiernach die Pankreasesterase bedeutend wärmeempfindlicher zu sein als z. B. Saccharase. Vergl. hierzu Bd. I, S. 182.

Terroine gibt ferner an, dass das Enzym gegen Erwärmung in Gegenwart von Gallensalzen noch empfindlicher ist als das davon freie Enzym, und zwar könnte man aus seinen Zahlen für das durch Gallensalze aktivierte Enzym die Konstante $k_c = 3 \cdot 10^{-3}$ bei 40° annehmen.

Über den Einfluss der Temperatur auf den Reaktionsverlauf siehe S. 25.

Einfluss von Neutralsalzen.

Dass zahlreiche Neutralsalze, besonders Chloride der Alkalien und alkalischen Erden, die hydrolytische Wirkung der Pankreaslipase erhöhen, geht aus den Versuchen von Pottevin[1]), Kanitz, Terroine (l. c.), Minami[2]), Pekelharing[3]) u. a. hervor.

Folgendes Beispiel, der zitierten Arbeit von Pekelharing entnommen, zeigt, dass es sich um ganz beträchtliche Aktivierungen handelt:

4 ccm Lipaselösung (nach Rosenheim) wurden mit Hilfe von wenig Natriumkarbonat in Wasser zu einem Volumen von 200 ccm gelöst und in 4 Portionen zu je 50 ccm geteilt; jede enthielt 1 ccm neutrales Olivenöl; zu drei davon wurden wechselnde Mengen NaCl bzw. äquiv. Mengen $CaCl_2$, $BaCl_2$ und $MgCl_2$ zugesetzt; alle Lösungen wurden auf die gleiche Alkalinität, schwach rosa Phenolphthaleinfärbung (schätzungsweise pH = 8), gebracht. Nach sechsstündiger Digestion wurden verbraucht:

Zusatz	ccm 0,25 n. NaOH	Zusatz	ccm 0,25 n. NaOH
—	0,8	—	0,6
2 g NaCl	2,4	100 mg $CaCl_2$	1,4
4 g NaCl	4,6	220 mg $BaCl_2$	1,3
6 g NaCl	4,4	185 mg $MgCl_2$	2,7

Falk[4]) betont den grossen Unterschied zwischen Salzen 1-wertiger und 2-wertiger Metalle ($CaCl_2$).

Die Fettsynthese wird durch diese Neutralsalze nicht beschleunigt, sondern sogar gehemmt, wie Pekelharing nachgewiesen hat. Nach Ansicht dieses Forschers besteht die Rolle der untersuchten Salze darin, dass dieselben Fettsäure als Seife ausscheiden und so aus dem System entfernen, wodurch die Spaltung weiter fortschreiten kann.

[1]) Pottevin, C. r. 136, 767; 1904.

[2]) Minami, Biochem. Zs 39, 392; 1912.

[3]) Pekelharing, H. 81, 355; 1912. — Siehe auch Versuche von Hamsik, H. 71, 238; 1911.

[4]) Falk, Jl Biol. Chem. 36, 229; 1918.

Bei höheren Konzentrationen geht die beschleunigende Wirkung der Neutralsalze in eine hemmende über. Der Höhepunkt der Beschleunigung entspricht einer für jedes Salz besonderen Konzentration, welche in der Reihe Chlorid, Bromid, Jodid, Fluorid stark abnimmt. (Terroine).

Auch die Gallensalze üben zweifellos eine Salzwirkung aus, welche sich über ihre Lipoid-Wirkung und ihre spezifische Wirkung superponiert; dies wäre in künftigen Untersuchungen zu berücksichtigen.

Aktivatoren und Paralysatoren.

Fluornatrium. Eine besonders starke Neutralsalzwirkung auf Pankreasesterase übt das Fluornatrium aus, wenn es auch vielleicht hinsichtlich seiner Wirkungsart keine Sonderstellung gegenüber den anderen Alkalisalzen einnimmt. Seine stark hemmende Wirkung ist von Loevenhart u. Peirce[1]) studiert worden, welche aber auch angeben, dass minimale Mengen von NaF beschleunigen. Die verzögernde Wirkung des Fluornatriums äussert sich auf niedrige Ester, wie Äthylazetat, viel stärker als auf die Glyzeride der höheren Fettsäuren[2]). Über die Grenzen dieser Wirkungen gehen die Angaben der genannten Forscher und diejenigen von Terroine und Minami auseinander. Sehr wesentlich ist hier der Befund von Davidsohn[3]), dass Pankreasesterase gegen NaF sehr viel empfindlicher ist als Magenesterase. Davidsohn konnte in den meisten Versuchen mit Pankreaslipase erst bei einer NaF-Konzentration von 1 : 80000, in einem Versuch erst bei 1 : 240000 ein Aufhören der Hemmung beobachten, während sich die Magenesterase etwa 50mal resistenter zeigte; an Magenlipase beobachtete Davidsohn bei Konzentrationen von 1 : 1600 bis 1 : 3200 keine Hemmung mehr.

Die gefundene Verschiedenheit der beiden Esterasen gegen NaF scheint nicht auf einem verschiedenen Gehalt an Ca-Salzen zu beruhen, sondern deutet, wie Davidsohn betont, auf die Existenz zweier verschiedener Enzyme hin, was ja auch durch die Ungleichheiten der optimalen Azidität und durch das verschiedene Verhalten gegen Gallensäuren wahrscheinlich gemacht wird.

Als anorganische Aktivatoren sind ausserdem auch die Mangansalze zu nennen (Magnus[4]).

Anorganische Gifte sind ausser NaF alle Oxydationsmittel, besonders Ozon[5]) und Permanganat, ferner $HgCl_2$ und Arsensäure.

Organische Aktivatoren und Paralysatoren. Die Wirkung der gallensauren Salze ist S. 16 bereits besprochen worden; vergl. auch S. 25.

---

[1]) Loevenhart u. Peirce, Jl Biol. Chem. 2, 397, 1907.
[2]) Amberg u. Loevenhart, Jl Biol. Chem. 4, 149; 1908.
[3]) Davidsohn, Biochem. Zs 45, 284; 1912.
[4]) Magnus, H. 48, 376; 1906.
[5]) Kastle, Publ. H. a. M. H. Hyg. Lab. Bull. 26. — Biochem. Zbt. 5, 1181; 1906.

Saponin aus Quillajarinde aktiviert nach Flohr[1]) in kleinen Mengen (Maximum 2%; ev. besteht eine Beziehung zur Oberflächenspannung).

Der von Rosenheim[2]) gefundene Aktivator ist noch nicht geklärt.

Nach Minami[3]) enthalten Blut, Leber und Muskel Aktivatoren für Pankreasesterase.

Glyzerin beschleunigt, und zwar besonders durch seine Einwirkung auf die Dispersion der Fette und Öle[4]).

Bemerkenswert ist, dass Chloroform, welches im allgemeinen Enzymwirkungen nicht stört, die Esterase inaktivieren soll.

Eine Reihe von Lipoiden hemmen, z. B. Cholesterin; der Einfluss von Lezithin ist noch nicht klargelegt[5]).

Trypsin vernichtet die Pankreasesterase[6]).

Die sehr interessante Tatsache, dass der Pankreassaft eine mit der fettspaltenden Wirkung parallelgehende hämolytische Wirkung ausübt (Friedemann[7]), Wohlgemuth[8]), Neuberg und Reicher[9])) wird im Anhang unter „Lezithase" besprochen.

Kinetik.

Die mit Esterasen angestellten Versuche beziehen sich in der Regel auf Systeme mit makroskopisch wahrnehmbaren Grenzflächen (Suspensionen), da die meisten Lipasen in Wasser unlöslich sind. Lipolytisch wirksame Glyzerinauszüge lassen sich nach A. Kanitz[10]) aus Schweinepankreasdrüsen gewinnen. Mit diesen hat Kanitz die Hydrolyse von Olivenöl und Rizinusöl verfolgt.

Je 10 ccm Olivenöl werden in Reagenzgläsern mit 3,9 ccm 0,10 norm. Natronlauge, 0,25 ccm 1 norm. $CaCl_2$ und 1 ccm Lipaseextrakt vermischt und der Inhalt je eines Reagenzglases wird nach der unter t verzeichneten Minutenzahl titriert. Die dabei verbrauchten Kubikzentimeter 0,10 norm. Natronlauge sind unter x angegeben.

t	x	$\frac{x}{t}$	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
0	0,0	—	—
70	9,2	0,131	1,10
140	12,3	0,088	1,04
288	19,0	0,065	1,12
405	23,1	0,057	1,15
1455	34,2	0,023	0,90

1) Flohr, Ned. Tijdschr. Geneesk. 2, 1177; 1918.
2) Rosenheim, Jl of Physiol. 40, XIV; 1910.
3) Minami, Biochem. Zs 39, 392; 1912.
4) Kalaboukoff u. Terroine, C. r. 147, 712; 1908. — Terroine, Biochem. Zs 23, 404 1910.
5) Küttner, H. 50, 472; 1907. Daselbst ältere Literatur. Ferner Terroine, Soc. Biol. 68, 439, 518, 666, 754; 1910.
6) Terroine, Soc. Biol. 65, 329; 1908.
7) Friedemann, Dtsch. med. Woch. 33, 585; 1907.
8) Wohlgemuth, Biochem. Zs 4, 271; 1907.
9) Neuberg u. Reicher, Biochem. Zs 4, 281; 1907. — 11, 400; 1908.
10) Kanitz, H. 46, 482; 1905.

Auch Engel[1]) hat z. T. mit Lösungen gearbeitet, und zwar mit Glyzerinauszügen von Pankreatin „absolut", Rhenania, wobei 6 g Pankreatin 24 Stunden lang mit 250 ccm Glyzerin digeriert wurden, z. T. auch, wie in folgendem Versuch, mit eingewogenem festem Pankreatinpräparat (heterogenes System). Er kommt in seiner sorgfältigen Untersuchung mit der gleichen Methodik wie Volhard und Stade (vergl. S. 10 u. ff.) an Eigelb-Emulsion zum Resultat, dass die Schützsche Regel bei der enzymatischen Fettverseifung gilt, dass also bei gleicher Verdauungszeit die Verdauungsprodukte sich verhalten wie die Quadratwurzeln aus den Enzymmengen, und dass bei gleichen Fermentmengen die Verdauungsprodukte sich verhalten wie die Quadratwurzeln aus den Verdauungszeiten. Für ein und denselben Saft muss demnach gelten:

$$x = k\sqrt{Et}.$$

Dies ist bei Engels Versuchen auch der Fall.

	4 Stunden			9 Stunden			25 Stunden			
ınkreatin	x beob.	x ber.	$\frac{x}{\sqrt{Et}}$	x beob.	x ber.	$\frac{x}{\sqrt{Et}}$	x beob.	x ber.	$\frac{x}{\sqrt{Et}}$	
0,04 g	17,6	16,8	4,4	18,4	24,5	3,1	35,0	38,3	3,5	Temp. 41°.
0,09 g	20,9	24,5	3,5	36,3	35,0	4,0	58,2	53,0	3,8	
0,16 g	35,2	31,6	4,4	48,4	44,6	4,0	72,1	65,0	3,6	

Die Berechnung der Werte $x_{ber.}$ ist nach der Arrheniusschen Formel (28) (Bd. I, S. 126) mit der Konstanten $\varkappa = 1,0$ ausgeführt worden. Die Abweichungen sind, wie man sieht, nicht unerheblich.

Schon vor Kanitz und Engel haben Kastle und seine Mitarbeiter[2]) die Esterasespaltung niederer Ester kinetisch untersucht; zur Verwendung kamen trübe, durch Tuch filtrierte, wässerige Extrakte von Schweinepankreas.

Röhrchen, welche 4 ccm Wasser, 0,26 ccm Äthylbutyrat und 0,1 ccm Toluol enthielten, wurden während 5 Minuten auf 40° erwärmt. Dann wurde 1 ccm eines 10%igen Extraktes hinzugefügt; nach bestimmten Zeiten wurde mit 0,05 n. KOH titriert. P = E = Enzymmenge.

Minuten		$k \cdot 10^4$	$\varkappa \cdot P$
5	(6,53)	135	(0,45)
10	(8,66)	91	(0,40)
15	8,53	60	0,26
20	9,54	50	0,24
25	10,67	50	0,24
30	(9,41)	33	(0,16)
60	17,32	32	0,28
120	25,35	24	0,32
180	28,36	18	0,28

Die nach dem Reaktionsgesetz 1. Ordnung berechnete Konstante k sinkt stark und stetig. Eine Interpolation zeigt übrigens, dass die Beobachtungs-

[1]) Engel, Hofm. Beitr. 7, 77; 1905.

[2]) Kastle u. Loevenhart, Amer. Chem. Jl 24, 491; 1900. — Kastle, Johnston u. Elvove, ebenda 31, 521; 1904.

fehler, vermutlich wegen der Schwierigkeit, so kleine Estervolumen genau zu pipettieren, sehr gross waren.

Die Geschwindigkeit der Esterspaltung fanden die Autoren angenähert proportional der Enzymkonzentration.

Mit einiger Annäherung schliessen sich die obigen Versuchszahlen der Schützschen Regel, $x = k\sqrt{t}$ an (Bd. I, S. 124). In der letzten Spalte finden sich die Werte $\varkappa P$, die ich früher nach Formel (28) $\varkappa Pt = a \ln (a)/(a - x) - x$ berechnet habe (Bd. I, S. 126). Dass diese Werte einigermassen konstant sind, dürfte nicht von grösserer Bedeutung sein. Die Formel (28) ist unter der Annahme abgeleitet, dass die Konzentration des freien Enzyms der Konzentration der Reaktionsprodukte umgekehrt proportional ist. Die gleiche Formel ergibt sich unter der, wenigstens in diesem Fall wahrscheinlichsten Annahme, dass nicht die Konzentration, sondern die Wirksamkeit des Enzyms umgekehrt proportional mit den Reaktionsprodukten ist, von welchen in erster Linie die Säure in Betracht kommt.

Wie Kastle und Loevenhart gefunden haben und seither mehrfach bestätigt wurde, ist nämlich die Pankreaslipase stark säureempfindlich (optimales $pH = 8$). Es würde sich wohl lohnen, zu untersuchen, ob nicht die Formel für monomolekulare Reaktionen recht angenähert gilt, wenn von vornherein durch Zusatz eines geeigneten Puffers die optimale Azidität konstant gehalten wird.

Die Arbeit von Kastle und Loevenhart ist auch deswegen bemerkenswert, weil in derselben der enzymatischen Synthese der Ester Aufmerksamkeit gewidmet worden ist.

Nachdem auch Pottevin[1]) die enzymatische Bildung von Mono- und Triolein beobachtet und studiert hatte — eine seiner Versuchsreihen ist bereits in Bd. I, S. 215 mitgeteilt worden — hat Dietz das Problem einer eingehenden quantitativen Bearbeitung unterworfen.

Dietz[2]) hat ein heterogenes System studiert; Pankreasesterase wurde in Form geschabter Gewebefasern von der Pankreasdrüse des Schweines in Amylalkohol emulgiert, welcher Wasser und Buttersäure bzw. Amylbutyrat gelöst enthielt.

Man erwartet zunächst die Geschwindigkeitsgleichung:

$$\frac{dx}{dt} = k_1\, C_{\text{Säure}} \cdot C_{\text{Alkohol}} - k_2\, C_{\text{Ester}} \cdot C_{\text{Wasser}},$$

wobei sich alle Konzentrationen auf die „Enzymphase" beziehen. Die Konzentration von Wasser und Alkohol ist annähernd konstant, da durch die Vorgänge stets nur kleine Mengen verschwinden. Andererseits sollen sich die Stoffe zwischen Enzym und Flüssigkeit nach dem Nernstschen Verteilungssatz verteilen, d. h. $C_{\text{Enzym}} = \alpha \cdot C_{\text{Lösung}}$. Die Proportionalitätsfaktoren, wie die konstanten Konzentrationen von Alkohol und Wasser, gehen in die Kon-

---

1) Pottevin, C. r. 136, 1152; 1903 u. 137, 378; 1904. — Ann. Inst. Pasteur, 20, 901; 1906.

2) Dietz, H. 52, 279; 1907. Siehe auch Bodenstein u. Dietz, Zs f. Elektroch. 12 605; 1906.

stanten ein, und man erhält daher:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 C_{Säure} - k_2 C_{Ester} = k_1 (a - x) - k_2 x.$$

Löst man nur wenig Wasser in Amylalkohol, so wird die Gegenreaktion sehr klein, und der Vorgang verläuft einfach nach:

$$\frac{dx}{dt} = k (a - x)$$

ɔlgende Tabelle erkennen lässt:

a = 0,10 normal

Stunden	3,5 % H_2O Millimol Säure pro Liter	$k \cdot 10^4$	t Stunden	5,01 % H_2O Millimol Säure pro Liter	k · 1ı
0,00	100,00	—	0,00	100,00	—
2,50	97,06	64	2,00	94,12	130
9,57	87,10	62	5,53	87,82	100
14,35	80,84	64	10,33	76,38	120
24,45	69,74	63	15,17	67,54	120
31,88	62,38	63	25,20	52,04	120
47,89	48,32	65	32,58	43,18	120
55,27	43,56	64	48,83	31,38	120
76,67	33,94	60	55,92	28,80	110
100,42	23,98	62	77,73	22,16	100
384	8,12	63	385	10,96	120

Geht man zu höheren Wassergehalten über, so stellt sich ein von beiden Seiten erreichbarer Endzustand ein, und es wird die Geschwindigkeit der beiden entgegengesetzten Reaktionen messbar. Einen solchen Fall gibt die folgende Tabelle wieder.

6,5 % H_2O. — 5,01 g Enzym

t Stunden	Esterbildung Millimol Säure pro Liter	$k_1 \cdot 10^4$	t Stunden	Esterspaltung Millimol Säure pro Liter	$k_2 \cdot 1$
0,00	100,00	—	0,00	0,00	—
3,90	93,74	72	6,67	2,50	18
10,52	80,83	90	19,73	6,50	18
13,75	77,50	89	32,65	8,08	15
23,32	65,00	84	68,10	12,50	15
29,25	59,17	83	94,30	13,08	16
36,20	53,33	82	142,31	14,00	
47,97	45,00	81	215,50	15,00	
71,68	33,34	81	∞	16,25	
97,57	27,08	76			
∞	16,25	82			

Nach dem Massenwirkungsgesetz soll gelten (vergl. Bd. I, Kap. 7, S. 208 u. ff.; wie daselbst S. 210 erwähnt, bezeichnet Bodenstein mit K den reziproken Wert)

$$\text{Gleichgewichtskonstante } K = \frac{C_{Ester}}{C_{Säure}} = \frac{k_1}{k_2}.$$

Dies war zwar bei obigem Versuch der Fall; es wurde nämlich gefunden:

$$K = \frac{C_{Ester}}{C_{Säure}} = 5,2 \quad \text{und} \quad \frac{k_1}{k_2} = \frac{82}{16} = 5,1.$$

Indessen zeigen die verschiedenen Versuchsreihen von Dietz, besonders diejenigen mit 8% Wasser, durchaus keine Übereinstimmung; die Gleichgewichtskonstanten K bzw. k_1/k_2 nehmen ganz verschiedene Werte an, wie z. B. der Vergleich des folgenden Versuchs mit dem obigen zeigt:

8% H_2O. — 5,01 g Enzym

Esterbildung: t Stunden	Millimol Säure pro Liter	$k_1 \cdot 10^4$	Esterhydrolyse: t Stunden	Millimol Säure pro Liter	$k_2 \cdot 10^4$
0,00	100,00		0,00	0,00	
1,98	94,04	140	3,63	5,60	75
4,00	88,22	140	7,60	10,82	77
6,98	80,60	140	16,77	17,54	64
11,55	67,90	160	24,05	22,02	70
14,98	62,69	160	89,30	31,34	
25,10	48,88	160	∞	31,42	
96,95	31,72				
∞	31,42				
		Mittel 150			Mittel 72

Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge, welche schon Kastle und Loevenhart gefunden hatten, zeigte sich auch hier, und zwar sowohl hinsichtlich der Spaltungs- als der Bildungsgeschwindigkeit des Esters:

Wassergehalt	Enzymmenge	Konstanten × 10^4: k_1	k_2
8%	5,01 g	150	72
	10,02 g	280	140

Dieser Befund steht auch in Übereinstimmung mit dem von Pottevin (l. c. Bd. I).

Bemerkenswert ist, dass nach den Angaben von Dietz der Gleichgewichtszustand im homogenen System und bei Anwendung einer Säure als Katalysator einen ganz anderen Betrag erreicht, als bei Verwendung des Enzyms. Berechnet man die Gleichgewichtskonstante nach der Formel

$$K = \frac{[\text{Ester}]\,[\text{Wasser}]}{[\text{Säure}]\,[\text{Alkohol}]}$$

und setzt für die molare Konzentration des Wassers 4,44 und für Alkohol 8,2 (Zahlen die für 8% Wassergehalt gelten), so erhält man für das homogene System K = 3,2, während die Enzymversuche ergaben:

Anfangskonzentration	= 0,05 n	0,10 n	0,20 n
K	= 0,70	1,2	1,8

Eine erneute Durcharbeitung dieser Verhältnisse unter genauer Berücksichtigung der Azidität und der Menge mitwirkender Aktivatoren (Co-Enzyme) erscheint erforderlich.

Besonders zu berücksichtigen ist bei weiteren Versuchen der Befund von Terroine[1]), dass Gallensalze nicht nur die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch das Gleichgewicht im Endzustand ändern. Es ist zu schliessen, dass die aktive Masse wenigstens einer Reaktionskomponente (Ester bzw. Säure) durch den Zusatz der Gallensalze geändert wird. Unter den quantitativen Ergebnissen Terroines sei noch hervorgehoben, dass die Wirkungsweise der Gallensalze stets dieselbe ist, welches auch der zu spaltende Körper sei. Für die Spaltung der Ester und Triglyzeride niederer Säuren stellte Terroine ein Konzentrationsoptimum der Gallensalze fest.

Auch Synthesen der höheren Fettsäuren durch Pankreasesterase (Pulver) sind durchgeführt worden, und zwar des Amylesters der Stearinsäure von Pottevin, des Glyzerinesters der Palmitin- und Stearinsäure von Hamsik[2]).

Einfluss der Temperatur auf die Kinetik.

Nach den Untersuchungen von Kastle und Loevenhart (l. c.) an Äthylbutyrat hat die enzymatische Spaltung dieses Esters einen recht kleinen Temperaturkoeffizienten (vergl. Bd. I, S. 192); zwischen 20° und 30° beträgt der Quotient $k_{t+10} : k_t$ rund 1,3; die Konstante A ist rund 5000. Nach Terroine soll der Temperaturkoeffizient der Hydrolyse ein wenig von der Natur des Substrates abhängig sein. Aus Terroines Zahlen für Äthylbutyrat findet man $k_{t+10} : k_t$ zu etwa 1,9 (zwischen 15° und 25°) und A rund 11000. Es wird eine „optimale Wirkungstemperatur“ von etwa 40° angegeben.

Der Temperatureinfluss auf das Enzym selbst und auf die Reaktion ist offenbar bei wechselnder Azidität untersucht worden. Auf die Temperaturkurven, deren Koordinatenbezeichnung unvollständig ist, sei hier nur verwiesen (l. c. S. 422 u. 423). Bei 54° soll die Hydrolyse „fast Null sein“.

Hinsichtlich der Wärmeempfindlichkeit des Enzyms selbst kommt Terroine (Biochem. Zs 23) zu den auf S. 18 angegebenen Resultaten.

Einwirkung der Kinase.

Wenn man durch Zugabe von Kinase Pankreassaft proteolytisch aktiv macht, tritt eine rasche Abnahme des lipolytischen Vermögens ein. Diese bleibt aber aus, wenn der Pankreassaft, wie im Darm, auf fremdes Eiweiss einwirkt.

Messung kleiner Enzymmengen durch Duodenalsondierung siehe S. 44.

---

[1]) Terroine, Biochem. Zs 23, 404; 1910.

[2]) Hamsik, H. 71, 238; 1911. — 90, 489; 1914.

Technische Anwendung.

In der Gerberei wird nunmehr an Stelle von Kot verschiedener Tiere, dessen Enzymgehalt früher zur Bearbeitung feinerer Ledersorten ausgenützt wurde, vielfach die lipolytische Wirkung von Pankreaspräparaten verwendet.

So soll die Beize Oropon der Firma Röhm & Haas eine intensive fettspaltende Wirkung (Röhm D.R.P. 200519, 203889, 217934, kl. 28a. Gr. 2) besitzen.

3. Darmesterase.

Enzymmaterial. Auch hier kommt in erster Linie der sezernierte Saft in Betracht, wie ihn Boldyreff[1]) erhalten hat.

In zweiter Linie lässt sich die Lipase der Darmschleimhaut verwenden[2]), welche aus dieser extrahiert werden kann.

Auch im Darminhalt (Meconium) menschlicher und tierischer Föten finden sich Enzyme, welche sowohl Ester als Lezithin spalten (Pottevin, Ibrahim, Porcher und Tapernoux).

Verhalten. Im allgemeinen scheint die Darmesterase der Pankreasesterase ganz nahe zu stehen. Soweit es sich um Duodenalsaft handelt, ist überhaupt eine Scheidung hinsichtlich des Ursprunges schwierig.

Nach Kalaboukoff und Terroine (l. c.) wird Darmesterase durch Gallenstoffe weniger energisch aktiviert als Pankreasesterase; dies kann aber darauf beruhen, dass die untersuchte Darmesterase schon von vornherein eine gewisse Menge Aktivator erhalten hat.

Über eventuelle Lokalisation im Darm siehe Frouin[3]), Camus und Nicloux[4]).

K. G. Falk[5]) nimmt auf Grund eigener Versuche zwei Esterasen im menschlichen Duodenum an. Die eine, welche in der Regel nach Aufnahme von Nahrung gefunden wurde, erwies sich aktiver gegen Triazetin als gegen Äthylbutyrat. Die andere, die anwesend war, wenn keine Nahrung aufgenommen wurde, soll umgekehrt gegen Äthylbutyrat wirksamer sein als gegen Triazetin.

Neutralsalze üben in 1 n.-Lösungen auf beide Enzyme ausgesprochene Hemmungen aus, die in folgender Reihenfolge steigen: Chloride, Bromide, Fluoride, Jodide.

Methyl- und Äthyl-Alkohol sollen schon in 0,1 mol. Lösung hemmen.

4. Esterasen der Gewebe.

Esterspaltung wurde in den Extrakten der meisten daraufhin untersuchten Gewebe nachgewiesen (Loevenhart[6]), Pagenstecher[7]), Winternitz

[1]) Boldyreff, H. 50, 394; 1907.
[2]) Umber u. Brugsch, Arch. f. exp. Pathol. 55, 164; 1906. — Rona, Biochem. Zs 23, 482; 1911.
[3]) Frouin, Soc. Biol. 61, 665; 1906.
[4]) Camus u. Nicloux, Soc. Biol. 68, 619; 1910.
[5]) Falk, Jl. Amer. Chem. Soc. 36, 1047; 1914.
[6]) Loevenhart, Amer. Jl Physiol. 6, 331; 1902.
[7]) Pagenstecher, Biochem. Zs 18, 285; 1908.

und Meloy[1]), Juschtschenko[2]), Rona[3]), Freudenberg[4]), Porter[5]), Bach[6])). Die davon abweichenden Resultate von Saxl[7]) sind nicht bestätigt worden.

Abgesehen von Pankreas ist stets die Leber am reichsten an Esterase gefunden worden, dann folgen Milz, Lunge, Fett usw. in einer Reihenfolge, die bei verschiedenen Tierarten offenbar wechselt.

a) Leber.

Leberesterase ist zuerst eingehend von Kastle[8]) und Loevenhart[9]) und ihren Mitarbeitern, ferner von Ramond[10]) untersucht worden.

Enzymmaterial. Die zerkleinerte Leber wird von Kastle[9]) und Loevenhart mit angesäuertem Wasser extrahiert und das Extrakt filtriert, wobei allerdings ein nicht unerheblicher Teil der Enzymwirkung verloren geht.

Auch mittels Glyzerin lässt sich Leberesterase geeignet extrahieren; wie andere Enzyme, so soll auch diese Esterase in Glyzerin jahrelang haltbar sein. (Simonds[11])).

Dakin[12]) zerreibt Schweineleber mit Kieselgur und Sand und zentrifugiert zur Reinigung den durch hydraulisches Auspressen gewonnenen Saft, der auf Eis mehrere Wochen haltbar ist.

Ähnlich arbeitet Peirce[13]); 100 g Schweineleber, mit Sand und Wasser vermahlen und durch ein Tuch getrieben, werden mit destilliertem Wasser auf ein Liter verdünnt. Die mit Toluol versetzte Flüssigkeit steht einen Tag bei 37°, dann mehrere Wochen bei Zimmertemperatur und wird dann filtriert.

Reinigung des Präparates. Die obige Enzymlösung wurde von Peirce 5—6 Tage in Kollodiumsäcken dialysiert und filtriert. Dabei verlor die Lösung 90 % ihrer Trockensubstanz und gleichzeitig etwa 20 % ihrer Aktivität, so dass die Reinigung beträchtlich war. Die so bereitete Lösung wurde nun mit Ammoniumsulfat halbgesättigt, worauf bis zur Klarheit filtriert wurde; der Niederschlag war inaktiv und wurde verworfen. Das Filtrat wurde nun mit Ammoniumsulfat ganz gesättigt. Nach Filtration erwies sich nun das Filtrat inaktiv. Der Niederschlag wurde in Wasser aufgenommen

---

1) Winternitz u. Meloy, Jl Med. Research 22, 107; 1910.
2) Juschtschenko, Biochem. Zs 25, 49; 1910: Über fettsp. Enzyme der Schilddrüse.
3) Rona, Biochem. Zs 32, 482; 1911.
4) Freudenberg, Biochem. Zs 45, 467; 1912.
5) A. E. Porter, Biochem. Jl. 10, 523; 1916.
6) A. Bach, Fermentf. 1, 151; 1916.
7) Saxl, Biochem. Zs 12, 343; 1908.
8) Kastle, Johnston u. Elvove, Amer. Chem. Jl 31, 521; 1903.
9) Kastle u. Loevenhart, Amer. Chem. Jl 24, 491; 1900. — Loevenhart, Jl Biol. Chem. 2, 597; 1906.
10) Ramond, Soc. Biol. 57, 342 u. 462; 1904. — Siehe auch Sieber, H. 55, 177; 1903.
11) Simonds, Amer. Jl Physiol. 48, 141; 1919.
12) Dakin, Jl of Physiol. 32, 199; 1904.
13) Peirce, Jl Biol. Chem. 16, 1; 1913.

und die Lösung dialysiert, bis keine Trübung mit $BaCl_2$ mehr eintrat. Diese hochgereinigte Lösung enthielt in 15 ccm 4,8 mg Trockensubstanz. 20 ccm dieser Lösung in einem Totalvolumen von 560 ccm hydrolysierten 650 mg Äthylbutyrat in 28,1 Minuten (Endazidität: 10 ccm 0,05 n.-Säure in 50 ccm Reaktionsmischung).

Herstellung der Enzymlösungen nach Rona: Siehe Biochem. Zs 32.

Leberesterasen sind hauptsächlich an Estern niederer Fettsäuren untersucht worden; gegen natürliche Fette sind sie jedenfalls weniger wirksam als die Magenlipase und pflanzliche Lipasen; einen diesbezüglichen Vergleich an verschiedenen Substraten findet man bei H. E. Armstrong und Ormerod[1]).

Leberbrei spaltet auch Amylsalizylat (Magnus; Loevenhart, Jl Biol. Chem. 2).

Optimale Azidität. In dieser Hinsicht scheint die Esterase der Leber der Pankreasesterase nahezustehen, mit einem pH-Optimum zwischen 7 und 8.

Aktivatoren und Paralysatoren. An Leberesterase hat Kastle[2]) die Wirkung von zahlreichen anorganischen Stoffen in äquivalenten Mengen untersucht.

Starke Giftwirkung wurde gefunden bei: Ozon, Chlor, Brom, Natriumfluorid, Succinylperoxyd, Jodcyan, Kaliumpermanganat.

Deutliche, aber schwächer hemmende Wirkung üben aus: Sublimat, Chromsäure, Kupfersulfat und Perosmiumsäure.

Nahezu ungiftig sind nach Kastles Befund: Silbernitrat, Jodwasserstoffsäure, Formaldehyd, Trikresol, Blausäure, Kaliumnitrit und Bernsteinsäure. Ferner Toluol und Chloroform.

Temperatureinfluss. (Vergl. Bd. I, S. 191.) Kastle und Loevenhart und später Kastle, Johnston und Elvove haben den Temperaturkoeffizienten der Äthylbutyratspaltung gemessen. Für die angegebenen Temperaturen ergaben sich die untenstehenden Geschwindigkeiten und die daraus berechneten Quotienten $k_{t+10} : k_t$:

Temp.	— 10°		0°		10°		20°		30°		40°
v	0,70		2,26		3,89		5,27		6,96		(11,29)
$k_{t+10} : k_t$		3,23		1,72		1,36		1,10		1,89(?)	

Eine so starke Abnahme des Quotienten $k_{t+10} : k_t$ fanden später Kastle, Johnston und Elvove (l. c.) nicht; sie geben folgende Zahlen an:

Temp.	0°		10°		20°		30°		40°
$\cdot 10^4$	7,1		12,6		21,8		37,4		58,1
$k_{t+10} : k_t$		1,77		1,73		1,71		1,55	

Berechnet man aus diesen Zahlen den Koeffizienten A der Temperaturformel (29) Bd. I, S. 172, so ergibt sich ein Mittelwert von rund $A = 9000$.

[1]) H. E. Armstrong u. Ormerod, Proc. Roy. Soc. B 78, 376; 1906.
[2]) Kastle, Hyg. Labor. Treas. Dep. Bull. Nr. 26; 1906.

Auch hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes der Esterspaltung verdankt man die ersten Versuche Kastle und Loevenhart (1900), weitere Messungen Kastle, Johnston und Elvove.

Wie bei den Versuchen mit Pankreasesterase schliessen sich die erhaltenen Spaltungswerte der Formel für monomolekulare Reaktionen nicht gut an; die Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung fallen nämlich mit fortschreitender Reaktion; nach Auffassung der genannten Autoren rührt dies davon her, dass die entstehende Säure hemmend wirkt; die von der Säure nicht gestörte Reaktion betrachtet Kastle als monomolekular (tatsächlich wären entsprechende Messungen mit konstant gehaltenem pH erwünscht). In folgendem Beispiel (Temp. 21°) ist der Abfall von k, abgesehen vom 1. Wert, verhältnismässig gering:

Minuten	30	60	64	97	121	132	198	204	361	467
x in ccm	(0,95)	1,30	1,45	1,80	2,05	2,25	2,75	2,90	3,50	3,80
$k \cdot 10^4$	(75)	54	57,5	50	47	49	44	47	38	35

Bei Variation der Esterkonzentration ist aber der Reaktionskoeffizient k nicht, wie es bei monomolekularen Reaktionen sein sollte, von der Substratkonzentration unabhängig, sondern wurde um so kleiner gefunden, je grösser die Esterkonzentration a war. Wie bei vielen anderen Enzymkonzentrationen erwies sich hier k·a annähernd konstant.

Hier ist auch eine Dissertation von A. Schmidt[1]) zu erwähnen, in welcher die Spaltung der Methyl- und Äthylester der Morphinglykolsäure durch den Lebersaft des Kaninchens studiert wurde. Der zeitliche Verlauf der Spaltung soll der Formel folgen:

$$k = \frac{1}{t\sqrt{E}} \ln \frac{}{a-x}$$

wo E die Enzymkonzentration bedeutet.

Schliesslich hat Peirce[2]) eine gute dynamische Untersuchung der Äthylbutyrathydrolyse durch Schweineleberesterase ausgeführt. Auch er stellt fest, dass die Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung im allgemeinen abnehmen und erkennt die Bedeutung der Azidität für den Verlauf der Reaktion. „In einer Lösung vom gegebenen Volumen und gegebener Azidität ist die zur Hydrolyse einer bestimmten Menge Äthylbutyrats erforderliche Zeit umgekehrt proportional der Enzymkonzentration. Unter gleichen Aziditätsbedingungen hydrolysiert jedes Enzymteilchen dieselbe absolute Estermenge per Zeiteinheit, unabhängig von der Konzentration des Enzyms.“

„Bei einer gegebenen Enzymkonzentration ist die zur Hydrolyse einer gegebenen Estermenge erforderliche Zeit abhängig von der Säurekonzentration

[1]) A. Schmidt, Über eine Entgiftung durch Abspaltung der Methyl- und Äthylgruppe im Organismus. Dissert. Heidelberg 1901.

[2]) Peirce, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 1517; 1910.

aber unabhängig von der Esterkonzentration, falls diese grösser als 0,005 n. ist. Bei jeder Azidität hydrolysiert also eine gegebene Enzymmenge innerhalb eines weiten Bereichs der Esterkonzentration sehr nahe die gleiche Menge Äthylbutyrat."

Peirce versucht diese Tatsache mit dem Massenwirkungsgesetz durch die Annahme in Übereinstimmung zu bringen, dass Enzym und Ester zu einer Zwischenverbindung zusammentreten, welche bei Esterkonzentrationen über 0,005 n. den grössten Teil des Enzyms enthält.

Siehe hierzu die Berechnungen von Michaelis und von van Slyke und Cullen, Bd. I, S. 108 u. ff.

Synthese. Wie mit Pankreas hat Hamsik[1]) auch mit Rindsleber Esterbildung (Aziditätsverminderung) beobachtet.

Asymmetrische Wirkungen. Mit Esterase aus Schweineleber hat Dakin[2]) seine interessanten asymmetrischen Spaltungen der Mandelsäure ausgeführt (Bd. I, S. 256).

b) Fettgewebe.

Extrahiert man frisches Schweinefett mit dem gleichen Gewicht Wasser bei 40° 1 Stunde lang und filtriert den auf 35° abgekühlten Auszug, so erhält man eine klare Lösung, welche Äthylbutyrat kräftig spaltet. Folgende Tabelle bezieht sich auf eine Messung des Verf.[3]), mit bei 17° ges. Äthylbutyratlösung bei 35°.

Minuten	ccm Barytlös.	a — x	k · 1[illegible]
0	0	2,70	—
2	0,3	2,40	256
6	0,75	1,95	235
9	1,05	1,65	237
16	1,65	1,05	250

Die, wie ersichtlich, schnelle Spaltung verläuft als Reaktion 1. Ordnung.

Freudenberg[4]) fand im Fettgewebe eines frischgetöteten Hundes und im Fett eines hungernden Kaninchens nur sehr geringe Fettspaltung (weniger als 1% des Gesamtfettes pro Tag).

c) Verschiedene Organe.

In Milz[5])[6])[7]), Lungen[6])[8]), Nieren[6])[9]) sowie in Thyreoidea[10]), Plazenta[11]) und in Muskeln[6]), peripheren Nerven[12]), meist qualitativ, nachgewiesen.

[1]) Hamsik, H. 90, 489; 1914.
[2]) Dakin, Jl of Physiol. 30, 253; 1903 und 12, 199; 1905.
[3]) Euler, Hofm. Beitr. 7, 1; 1905. — Im Fettgewebe von Hühnern haben Pennington u. Hepburn (1911) eine Esterase gefunden.
[4]) Freudenberg, Biochem. Zs 45, 467; 1912.
[5]) Pagenstecher, Biochem. Zs 18, 285; 1908.
[6]) Rona, Biochem. Zs 32, 482; 1911.
[7]) Tanaka, Biochem. Zs 37, 249; 1911.
[8]) Sieber, H. 55, 177; 1908. — Saxl, Biochem. Zs 12, 343; 1908. — Sieber u. Dzierzgowski, H. 62, 263; 1909.
[9]) Battesti u. Baraja, Soc. Biol. 55, 820; 1903.
[10]) Juschtschenko, Biochem. Zs 25, 49; 1910. [11]) Savaré, Hofm. Beitr. 9, 141 1908.
[12]) Ukai, Tohoku, Jl of Exper. Medic. 1, 519; 1920.

5. Esterasen der Körperflüssigkeiten.

a) Blut.

Vorkommen. Ein esterspaltendes Enzym ist im Blut von Hanriot[1] entdeckt worden; die Wirkung wurde zunächst am Monobutyrin geprüft. Indessen ist nach dem Befund von Rona und Michaelis[2] Blut auch imstande, Tributyrin zu zerlegen, so dass sich die Annahme von Doyon und Morel[3] und von Arthus[4] von der Existenz einer besonderen Monobutyrinase im Blut wohl nicht mehr aufrecht erhalten lässt.

Über die physiologische Rolle der Blutesterase herrscht noch keine Klarheit; möglicherweise stammen die Blutesterasen ganz oder teilweise aus Organen und Geweben[5]; vermutlich ist die Leber an der Fettregulation des Blutes beteiligt. Bemerkenswert ist, dass die lipolytische Fähigkeit des Blutes ansteigt, wenn nach Hungertagen grosse Fettmengen (Rüböl, Talg) verfüttert werden (Abderhalden und Rona[6]). Der Gehalt des Blutes an Fett zeigt übrigens im Hungerzustande keine wesentliche Änderung (E. Freudenberg[7]).

Über die Bedeutung der Blutlipasen für den Fettstoffwechsel der Zellen siehe auch G. Bayer, Zs Biol. 69, 365; 1919.

Die Änderungen des fettspaltenden Vermögens des Blutes bei verschiedenen Krankheiten ist oft untersucht worden. Eine weitere Verfolgung verdient die Frage, ob eine Beziehung zwischen der Verteilung der Esterasen im Körper und seiner Widerstandsfähigkeit gegen Tuberkulose besteht (Winternitz u. Meloy, Jl Med. Res. 107; 1910. — Achard u. Clerc, Soc. Biol. 54, 1144; 1902 und 56, 812; 1904. — A. E. Porter, Biochem. Jl 10, 523; 1916).

Die Esterase des Blutes ist irgendwie mit den Erythrozyten verknüpft, da Doyon und Morel[8], sowie Rona und Michaelis[2] im Serum die enzymatische Wirkung im allgemeinen bedeutend schwächer fanden als im Blut. Nur bei Meerschweinchen und Kaninchen ist Blut und Serum gleich, und zwar sehr stark, wirksam.

Optimale Azidität. Nach Rona[9] liegt das Optimum der Wirksamkeit der Serumlipase zwischen pH = 7 und 8,6. Die Figur 3 ist der Arbeit von Rona und Bien[10] entnommen.

---

[1]) Hanriot, C. r. 123, 753, 833; 1896 und 124, 778; 1897. — Soc. Biol. 48, 925; 1896. Hanriot u. Camus, C. r. 124, 235; 1897.

[2]) Rona u. Michaelis, Biochem. Zs 31, 345; 1911.

[3]) Doyon u. Morel, Soc. Biol. 55, 682; 1903.

[4]) Arthus, Jl de Physiol. Pathol. 4, 455; 1902.

[5]) Weder Pankreas noch Schilddrüse dürfte die Hauptquelle der Blutlipase bilden; siehe v. Hess, Jl Biol. Chem. 10, 381; 1911.

[6]) Abderhalden u. Rona, H. 75, 30; 1911. — Abderhalden u. Lampé, H. 78, 396; 1912. — Busquet u. Vischniac konnten im intravaskulären Blut keine Fettspaltung nachweisen (Soc. Biol. 83, 844; 1920).

[7]) Freudenberg, Biochem. Zs 45, 467; 1912.

[8]) Doyon u. Morel, Soc. Biol. 58, 616; 1905.

[9]) Rona, Biochem. Zs 33, 413; 1911.

[10]) Rona u. Bien, Biochem. Zs 59, 100; 1914 u. 64, 13; 1914.

Kinetik. Rona und Ebsen[1]) fanden die Reaktionskonstanten 1. Ordnung für die Tributyrinspaltung (gemessen nach der Methode von Rona und Michaelis, S. 45) nicht unabhängig von der Anfangsmenge des Tributyrins, sondern ihr umgekehrt proportional. Die Geschwindigkeit der Esterspaltung war direkt proportional der Enzymmenge. Der zeitliche Verlauf der Spaltung war mit Monobutyrin als Substrat ein anderer als mit Tributyrin, was kaum auffallen kann, da in letzterem Falle eine stufenweise Reaktion vorliegt.

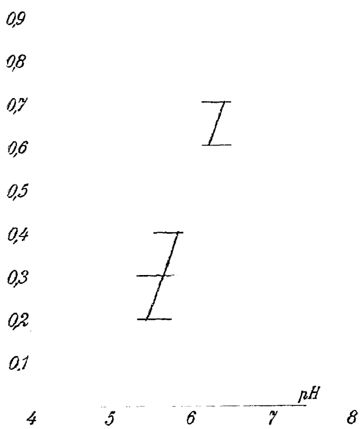


Fig. 3.
Wirkungskurve der Serumlipase nach Rona u. Bien.

Temperatureinfluss. Den Temperaturkoeffizienten der Esterspaltung durch Serumesterase hat Hanriot[2]) mit demjenigen der Pankreasesterase verglichen; er hat daraus Schlüsse auf die Verschiedenheit beider Enzyme gezogen, die nicht mehr als einwandfrei gelten können.

Über Lezithin-Spaltung im Blut siehe S. 47.

Paralysatoren. Über die Wirkung des Ätoxyls (Na-Salz der p-Aminophenyl-arsinsäure, $H_2N \cdot C_6H_4 \cdot AsO(OH)_2$, haben Rona und Mitarbeiter[3]) eingehende interessante Versuche angestellt. Für wechselnde Giftkonzentrationen wurde die Beziehung gefunden:

$$\frac{k_A - k_B}{\log B - \log A} = \text{konst}\ (\varkappa),$$

wo k_A und k_B die Geschwindigkeitskonstanten bei den Giftkonzentrationen A und B bedeuten.

Wirken auf verschiedene Enzymmengen dieselben Giftkonzentrationen, so sind die prozentischen Hemmungen bzw. die „Hemmungskoefffzienten" $h_A = \frac{k_0 - k_A}{k_0}$ gleich. Also ist $\frac{\varkappa}{k_0} = \text{konst.}$

Das l. c. S. 188 formulierte Ergebnis: „Sowohl die absolute wie die relative Empfindlichkeit des Fermentes gegen das Gift ist bei den verschiedenen Tierarten verschieden" dürfte durch den Zusatz: „in den entsprechenden Seren" zu ergänzen sein, da es sich in der erwähnten Untersuchung

[1]) Rona u. J. Ebsen, Biochem. Zs 39, 21; 1912.

[2]) Hanriot, C. r. 124, 778; 1897.

[3]) Rona u. Bach, Biochem. Zs 111, 166; 1920. — Rona u. György, ebenda 111, 115; 1920.

eben um Seren, nicht um gereinigte Enzymlösungen handelt, also die übrigen Bestandteile der Seren die „Empfindlichkeit“ wesentlich beeinflussen können.

b) Milch.

Der Nachweis einer Esterase in der Milch ist von Gillet[1]) und Hippius[2]) geführt worden.

Hinsichtlich der von Davidsohn (Biochem. Zs 49) bestimmten optimalen Azidität, etwa pH = 8, stimmt die Esterase der Frauenmilch mit der Pankreas- und Serumesterase angenähert überein und steht mit diesen im Gegensatz zur Magenesterase.

c) Harn.

Im normalen Harn sollen Esterasen nur spurenweise vorhanden sein (Taufani; Hewlett[3])). Letzterem Forscher zufolge gehen sie nach Störungen im Pankreas in den Harn über; desgleichen bei vermehrtem Lipasegehalt des Blutes bei Fieber und Leukozytenzerfall, ferner bei Nephritis, Ikterus und bei Polyurien (Pribram und Löwy[4])).

Bemerkenswert ist, dass der Speichel keine fett- und esterspaltende Wirkung zeigt.

B. Phyto-Esterasen.

1. Lipasen ölhaltiger Samen.

Green[5]) hat im Jahre 1890 in einer ausgezeichneten Abhandlung „On the germination of the seeds of the Castor-oil plant (Ricinus communis)“ auf die Rolle einer Lipase bei der Keimung von ölhaltigen Samen aufmerksam gemacht, und etwa gleichzeitig ist auch Sigmund[6]) zu ähnlichen Ergebnissen gekommen. Es handelte sich bei den Beobachtungen der beiden Forscher um die Spaltung eigentlicher Fette und Öle. Auf diese Substrate üben die pflanzlichen Esterasen (Lipasen) eine kräftige Wirkung aus. H. E. Armstrong und Ormerod[7]) haben einen Vergleich zwischen der Wirkung einer pflanzlichen (Rizinus) und tierischen Esterase auf verschiedene Substrate ausgeführt; dabei zeigte sich, dass pflanzliche Esterasen vom Typus der Rizinuslipase, welche eine hohe Wirksamkeit gegen eigentliche Fette besitzen, „niedere Ester“ verhältnismässig träge spalten, während z. B. wässerige Leber- oder Pankreasextrakte „niedere Ester“ energischer spalten als Fette und Öle. Immerhin

[1]) Gillet, Jl de Physiol. Pathol. 4, 439; 1902.
[2]) Hippius, Jahrb. Kinderheilk. 61, 365; 1905.
[3]) Hewlett, Jl Med. Research 11, 377; 1904.
[4]) Pribram u. Löwy, H. 76, 489; 1912.
[5]) Green, Proc. Roy. Soc. B. 48, 370; 1890.
[6]) Sigmund, Monatsh. f. Chem. 11, 272; 1900.
[7]) H. E. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B. 76, 606; 1905. — H. E. Armstrong und Ormerod, ebenda 78, 376; 1906. — Siehe hierzu auch die Versuche von Falk, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1904; 1913.

werden auch niedere Ester von Rizinuslipase angegriffen, wie folgende Zahlen von Armstrong und Ormerod zeigen:

Anzahl ccm 0,2 n. NaOH,
entsprechend der bei 25° nach 68^h enzymatisch gebildeten Säure.

Ester	Leberesterase	Rizinusesterase
Mandelsaures Äthyl	1,4	2,0
Benzoesaures Äthyl	3,9	0,8
Salizylsaures Methyl	0,3	0,4
Essigsaures Äthyl	10,35	9,9

Auch Glyzerinester sulfonierter Fettsäuren werden durch Rizinuslipase gespalten[1]).

Wie Connstein, Hoyer und Wartenberg[2]), denen man eine grundlegende Arbeit über Pflanzenlipasen verdankt, gefunden haben, werden von Rizinusenzym „sämtliche, technisch in Betracht kommenden Fette“ gespalten, allerdings nicht mit der gleichen Leichtigkeit. „Besonders in die Augen springend war das Verhalten der Butter, denn dieses Fett setzte den Spaltungsversuchen einen recht erheblichen Widerstand entgegen.“

Enzymmaterial. Nach Connstein, Hoyer und Wartenberg kommt die fettspaltende Wirkung nicht allen Pflanzensamen in gleich hohem Maasse zu, und zwar sind die Samen der Euphorbiaceen und speziell der Rizinusarten in dieser Hinsicht den übrigen untersuchten Samen wesentlich überlegen. Die von den genannten Forschern angewandten Rizinussamen bestanden aus:

47—51 % Rizinusöl, 28 % Schalen, 21—25 % Kuchen.

Die Samen werden zweckmässig in entschältem und entöltem Zustand angewandt. Das Rizinusöl kann man entweder kalt auspressen[3]) oder kalt extrahieren, ohne dem Enzym zu schaden; „insbesondere ist eine Behandlung des Samens mit Äther oder Schwefelkohlenstoff völlig indifferent“. (Falk und Nelson[4]) wandten zur Extraktion Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff an.) Die Anreicherung der Enzympräparate an wirksamer Substanz hat Hoyer[5]) bearbeitet.

George Falk[6]) vertritt die Auffassung, dass in manchen Pflanzensamen, z. B. Rizinussamen — wie übrigens auch in tierischen Organen — zwei verschiedene esterspaltende Enzyme enthalten sind, nämlich teils eine eigentliche Lipase, welche Fette und Öle angreift und durch ihre Löslichkeit in 1,5 n. Natriumchloridlösung charakterisiert sein soll, und eine Esterase, welche

---

[1]) Dubose, Caoutschouc et Guttapercha 16; 1919. Zitiert nach Zblt f. Bioch. 22, 307; 1920.

[2]) Connstein, Hoyer u. Wartenberg, Chem. Ber. 35, 3988; 1902.

[3]) Siehe hierzu auch Tanaka, Jl Coll. Engin. Tokyo 5, 125; 1912.

[4]) Falk u. Nelson, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 735; 1912.

[5]) Hoyer, Chem. Ber. 37, 1436; 1904.

[6]) Falk, Proc. Nat. Acad. of Science 1, 136, 1915. — Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1904; 1913.

niedere Ester hydrolysiert und mit einer in Wasser löslichen Substanz verbunden sein soll.

Nicloux[1] verwendet zu seinen quantitativen Versuchen in Cottonöl suspendiertes Zytoplasma, und Jalander[2] ist diesem Beispiel gelegentlich gefolgt. Beide Forscher geben auch Vorschriften zur Herstellung von fettfreier, trockener und gereinigter Rizinuslipase.

200 g geschälte Rizinussamen werden fein zerstossen und mit 250 g Cottonöl innig verrieben. Man filtriert durch einen Leinenbeutel und zentrifugiert; dabei erhält man einen Bodensatz von gröberen, unwirksamen Teilchen und 230—250 g Aufschlemmung. Diese wird entölt, indem man zunächst der Aufschlemmung das gleiche Volumen Petroläther zumischt und absetzen lässt. Nach dem Abdekantieren wird der Bodensatz vollständig entölt. Die als weisses Pulver erhaltene Trockenmenge Enzym beträgt 2,5—3% der verarbeiteten Samenmenge.

Willstätter[3] hat neuerdings Verfahren zur Überführung der Lipasen, besonders des Rizinusenzyms in haltbare, trockene Form angegeben; dieselben bestehen in der Aufnahme der Lipasen aus Emulsionen und Suspensionen mit chemisch indifferenten Stoffen von grosser spezifischer Oberfläche, z. B. mit Kieselgur, Ton, Kaolin, Talk, Kohle oder Baryumsulfat.

Die Patentschrift gibt u. a. folgendes Beispiel:

Aus 1 kg geschältem Rizinussamen wird durch Verreiben mit 14 kg Wasser eine Milch hergestellt und diese bei einer Minutenumdrehungszahl von ungefähr 3000 zentrifugiert. Die entstandene Sahne, die ihre lipatische Wirksamkeit beim Entfetten oder Trocknen einbüssen würde, hebt man ab und verreibt sie innig mit 333 g Kieselgur. Das teigförmige Gemisch wird dann entweder in einer einzigen Operation durch Anrühren und Waschen mit Azeton, Alkohol u. dgl. zugleich entfettet und getrocknet, oder es wird zuerst in Trocknungsapparaten entwässert und dann durch Extraktion mit Lösungsmitteln entölt.

Spaltungsprobe: 0,2944 g Kieselgurlipase (entsprechend 1 g ungeschältem Samen) ergaben mit 2,5 g Rüböl und mit 2 g Wasser bei 20° in 20 Minuten 18,5% Verseifung.

Ausser Rizinussamen sind noch zahlreiche andere ölhaltige Samen untersucht worden, so z. B. Kokosnuss[4], Kolanuss[5], Erdnuss (Arachis)[6], Lein[6], Mandeln[7] und besonders Sojabohnen[8] und Chelidoniumsamen[9]. Es sei ferner auf die Arbeiten von Fokin[10] und Gerber[11] verwiesen.

---

[1] Nicloux, Soc. Biol. 56, 701—868; ebenda 57, 84, 175; 1904.

[2] Jalander, Biochem. Zs 36, 435; 1911.

[3] Willstätter, D.R.P. Nr. 316504, Kl. 12 o, Gr. 26, 1918.

[4] Lumia, Malys Jahrb. 1898, 724.

[5] Mastbaum, Chem. Zbt. 78, I, 978; 1907. — J. H. Driessen, Pharm. Weekblad 46; 1909.

[6] Dunlap u. Seymour, Jl Amer. Chem. Soc. 27, 935; 1905.

[7] Tonegutti, Staz. sperim. agrar. ital. 43, 723; 1910. — Chem. Zbt. 82, I, 332; 1911.

[8] Falk, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 649; 1915.

[9] Bournot, Biochem. Zs 52, 172; 1913 und 65, 140; 1914.

[10] Fokin, Chem. Zbt. 74, II, 1451; 1903. — 75, II, 1617; 1904.

[11] Gerber, C. r. 152, 1611; 1911.

Für die Darstellung aus Sojabohnen gibt Falk zwei Arbeitsmethoden an: 1. Gelbe, gemahlene Sojabohnen werden in einem Soxhletapparat mit Äther extrahiert, an der Luft getrocknet, gemahlen und gesiebt. 2. Man befreit die Sojabohnen mit der Hand von ihren Schalen, mahlt die Kerne, extrahiert mit Äther, trocknet an der Luft und siebt. Solche Sojapräparate hat Falk gegen Glyzeryltriazetat recht aktiv gefunden, viel weniger gegen Äthylbutyrat.

Ein von Falk in ähnlicher Weise hergestelltes Präparat aus Rizinussamen enthielt 7,5% Asche. Die Aschenanalyse ergab:

SiO_2	0,5%	MgO	26,0%
CaO	3,8%	P_2O_5	46,2%.

Für die von Falk[1]) nach der Angabe in Jl Amer. Chem. Soc. 37, 223; 1916 dargestellte Esterase fanden Falk und Sugiura[2]) 16—17% N. Dagegen gab die Lipase L I (ebenda S. 227) 17,9%, ber. auf wasser- und aschenfreies Material; L II gab 17,9% bzw. 18,4% N.

Ein Lipasepräparat aus Sojabohnen gab 15,5% N.

Nach Nicloux (l. c.) wirkt das von Rizinussamen abgetrennte Zytoplasma zwar wie ein Enzym; da er aber fand, dass die aktive Substanz von Wasser zerstört wird sobald keine Schutzwirkung durch Fette ausgeübt wird, so zählt er sie — auffallenderweise — nicht zu den Enzymen.

Schon Green gibt an, dass das Enzym nur in dem Endosperm des Rizinus vorhanden ist, nicht im Embryo.

Im ruhenden Samen von Rizinus ist Lipase nach Green nicht in aktivem Zustand vorhanden, sondern als Zymogen. Die Aktivierung des Zymogens wird durch Säuren erreicht; nach Nicloux wäre die Aktivierung proportional der Säuremenge[3]); Hoyer glaubte die in den Samen wirksame Säure als Milchsäure ansprechen zu können.

H. E. Armstrong und Gosney (Proc. Roy. Soc. B 86, 586; 1913) betrachten das Zymogen als ein „esterartiges Salz", das durch Säuren neutralisiert wird.

Aziditätsoptimum. Die Esterasen ölhaltiger Samen wirken in ausgesprochen saurer Lösung. Aus den Messungen von Jalander hat Sörensen eine optimale Azidität von ca. pH = 3 ermittelt[4]). Armstrong und Ormerod (l. c.) fanden keinen Zusammenhang zwischen der aktivierenden Wirkung verschiedener Säuren und ihren Dissoziationskonstanten. Dies entspricht auch dem früheren Befund von Hoyer[4]).

[1]) Falk, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 601; 1913.

[2]) Falk u. Sugiura, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 921; 1916.

[3]) Siehe aber Connstein, Hoyer u. Wartenberg, l. c. 3995 u. f., sowie Hoyer, Chem. Ber. 37, 1436; 1904.

[4]) Siehe hierzu auch Hoyer, Chem. Ber. 37, 1436; 1904.

Konzentration der Säure	0,01 norm.	0,02 norm	0,10 norm.	0,50 norm.	$K \cdot 10^5$
Essigsäure	5,45	14,9	14,6	13,6	1,8
Bernsteinsäure	2,80	14,6	15,4	12,2	6
Zitronensäure	7,25	15,3	14,7	1,1	82
Weinsäure	6,95	15,4	14,2	—	97

Die Art der zugesetzten Säuren scheint hiernach ohne erheblichen Einfluss zu sein, was so gedacht werden kann, dass durch sie nur der eigentliche Aktivator, vermutlich selbst eine schwache Säure, ev. Milchsäure, freigemacht wird. Es bleibt noch zu untersuchen, ob die zugesetzten Säuren auch in anderer Weise wirken als durch Einstellung der optimalen Azidität.

Aktivatoren und Paralysatoren. Was zunächst unspezifische Wirkungen betrifft, so tritt eine Beschleunigung mit manchen Neutralsalzen in ziemlich starker Konzentration ein (Tanaka[1]). Eine eingehendere Untersuchung verdankt man Falk[2]).

Besonders wirkt $MgSO_4$ noch in 0,1 molaren Lösungen beschleunigend; überhaupt zeigt SO_4''-Ion einen aktivierenden Einfluss; ferner wurden Beschleunigungen erzielt mit verdünnteren Lösungen von $BaCl_2$ und $CaCl_2$. Alle Salze mit einwertigen Ionen und — abgesehen von den grössten Verdünnungen — die Chloride von Baryum und Kalzium verzögern. Kaliumsulfat ist ohne Einwirkung.

NaF ist nach Connstein, Hoyer und Wartenberg ein starker Paralysator, ebenso $HgCl_2$, ferner Formaldehyd; Chloralhydrat ist unschädlich.

Als spezifische Wirkungen sind wohl diejenigen des Mangansulfats (0,2 % vom angew. Öl) und Manganchlorids anzusehen[3]).

Nach Falk[4]) kann Hitze-inaktivierte Lipase teilweise durch Mangansalze reaktiviert werden, welche dabei als Sauerstoffüberträger wirken sollen.

Hervorzuheben ist die Wirkungslosigkeit der Gallensäuren gegenüber Phytolipasen (Donath[5])).

Alkohol und Azeton verzögern[6]). Immerhin wirkt Rizinusenzym auf Methylazetat auch in wassergesättigtem Äther und wässerigem Azeton[7]).

Einfluss der Temperatur. Phytolipase scheint zu den besonders hitzeempfindlichen Enzymen gerechnet werden zu müssen. Connstein, Hoyer und Wartenberg geben an, dass bei 50° die Fettspaltung schon gehemmt wird. Trockene Präparate sind natürlich weit weniger empfindlich[8]) als solche in Berührung mit Wasser (vergl. Bd. I, S. 184).

---

[1]) Tanaka, Jl Coll. Eng. Tokyo 5, 142; 1912.

[2]) Falk, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 601; 1913.

[3]) Hoyer, Seifensiederztg. 32; 1905. — Chem. Zbl. 76, 582; 1905. — Falk und Hamlin, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 210; 1913.

[4]) Falk, Proc. Nat. Acad. of Science, 1, 136; 1915.

[5]) Donath, Hofm. Beitr. 10, 390; 1907.

[6]) Falk, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 616; 1913.

[7]) Falk u. Nelson, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 735; 1912.

[8]) Falk, Proc. Nat. Acad. of Science, 2, 557; 1916.

Wie immer ist die Stabilität des Enzyms sowohl bei Zimmertemperatur als bei höheren Wärmegraden eine Funktion der Azidität (Bd. I, S. 179 und Falk, Jl Biol. Chem. 31, S. 102).

Kinetik.

Nicloux[1]) verdankt man die ersten ausführlicheren Versuche über Rizinuslipasen oder, wie dieser Verfasser sagt, über die lipolytische Wirkung des Zytoplasmas von Rizinussamen. Nicloux fand sein Präparat unlöslich in Wasser; er emulgierte das Zytoplasma in dem zu hydrolysierenden Öl, meist Baumwollöl, und setzte verdünnte Essigsäure zu. Folgende Zahlen sind bei 18° erhalten:

t Min.	30	45		90	127	150	210	450.
Hydrolys. in %	23,6	33,1	40,4	54,8	67,0	73,2	85,5	94,4
$k = \frac{100}{t} \log \frac{100}{100 - x}$	0,388	0,387	0,375	0,382	0,392	0,381	0,399	0,278

Der Schützschen Regel folgen die beobachteten Zahlen nicht. Dagegen gibt die für monomolekulare Reaktionen gültige Formel den beobachteten Gang der Hydrolyse ziemlich gut wieder.

Das Zeitgesetz der pflanzlichen Lipasen ist bald darauf auch von Connstein, Hoyer und Wartenberg eingehend untersucht worden. Dieselben haben zunächst die wesentliche Tatsache festgestellt, dass erhebliche Mengen freier Säure notwendig sind, um die Lipase zur Wirksamkeit gelangen zu lassen. Verreibt man nach Sigmunds Vorschrift (Monatsh. f. Chemie 11, 272; 1890) pulverisierte Rizinussamen mit Wasser und überlässt sie während 24 Stunden bei ca. 40° sich selbst, so beobachtet man tatsächlich nach Ablauf dieser Zeit durch Titrieren des Gemenges das Auftreten geringer Mengen Säure; lässt man solche Proben noch mehrere Tage stehen, so erfolgt nach einiger Zeit ein sprungweises rapides Ansteigen der Säuremenge. Dieser „Sprung“ tritt je nach der höheren (35—40°) oder niedrigeren (15—20°) Temperatur des Ansatzes bald früher (nach 2—3 Tagen), bald später (nach 4—6 Tagen) in Erscheinung.

5 g Rizinussamen mit 5 g 1%iger Chloralhydratlösung verrieben und bei 16° sich selbst überlassen:

Gefunden	sofort	nach 2 Tagen	4 Tagen	6 Tagen	8 Tagen
% Rizinusölsäure	1	3	52	59	59

Wir haben es hier mit einem Fall von Autokatalyse zu tun, wo also eines der Reaktionsprodukte den Fortgang der Reaktion beschleunigt.

Wie oben erwähnt, liegt die optimale Azidität etwa bei pH = 3.

In so stark sauren Lösungen ist ausser den Samenlipasen nur noch Pepsin wirksam. Der Gedanke, dass durch die Säure ein in den Samen vorhandenes Proenzym (Zymogen) in ein wirksames Enzym umgewandelt werde, ist nach den genannten Autoren zurückzuweisen,

[1]) Nicloux, Soc. Biol. 54, 840; 1902.

[2]) Connstein, Hoyer u. Wartenberg, Chem. Ber. 35, 3988; 1903.

denn wenn man die Samen längere Zeit mit dieser Säure behandelt, und die letztere dann entfernt, so ist in dem zurückbleibenden Samen keinerlei Veränderung zu konstatieren; derselbe wirkt in neutraler Lösung ebensowenig fettspaltend, wie vor der Säurebehandlung, und seine Wirksamkeit kann nur durch erneuten Säurezusatz hervorgerufen werden.

Um den Einfluss der Enzymmenge auf die Spaltungsgeschwindigkeit festzustellen, wurden 0,5 g Rizinussamen mit 5, 10, 15, 20, 25 und 50 g Rizinusöl und mit den gleichen Mengen 2%iger Essigsäure zur Emulsion verrieben.

0,5 g Rizinussamen wirken auf		x	
g Öl	g Essigsäurelös.	1 Tag	2 Tage
50	50	49	49
25	25	60	74
20	20	71	80
15	15	77	87
10	10	81	86
5	5	89	92

Über den zeitlichen Verlauf der Spaltung geben zahlreiche Versuche, unter anderen 38 und 46 Aufschluss. Die beiden letzteren sind folgendermassen angestellt: 5 g Rizinussamen wurden mit 6,5 g Rizinusöl und 4 g 0,1 n. Schwefelsäure bzw. 4 g Essigsäure verrieben.

Vers. 46.		Vers. 38.			
0,10 n. Schwefelsäure		0,10 n. Essigsäure		0,40 n. Essigsäure	
t Min.	x beob.	t Std.	x beob.	t Std.	x beob.
15	12	1	52	1	65
30	20	2	65	2	86
45	30	3	70	3	84
60	33	4	72	4	84
90	41	24	80	24	91
150	54				
210	59				
330	68				
1620	81				

Auch A. E. Taylor, welcher Triazetin, den Essigsäureester des Glyzerins, mit dem Pulver von Rizinusbohnen hydrolysiert hat, fand einen Reaktionsverlauf, wie bei monomolekularen Reaktionen. Er gibt folgende Resultate an, bei welchen ½-, 1- und 2%ige Lösungen von Triazetin zur Anwendung kamen. Die Konstanten k beziehen sich auf 18°.

	t Stunden	4	8	16	24	28	32	40	48
°/o	x beob.	0,096	0,162	0,287	0,418	0,489	0,477	0,623	0,652
	k	109	96	92	98	104	88	106	96
/o	x beob.	0,083	0,174	0,338	0,418	0,488	0,542	0,609	0,655
	k	94	104	112	98	104	106	102	96
/o	x beob.	0,098	0,174	0,323	0,431	0,502	0,485	0,595	0,636
	k	112	104	106	102	108	90	98	91

Wie es kommt, dass bei diesen Versuchen von Nicloux und Taylor die hydrolysierte Menge Fett nach dem einfachsten Zeitgesetz, welches für

homogene Systeme gilt, berechnet werden kann, lässt sich noch nicht ganz überblicken. Es ist bei der Hydrolyse von Fetten und Triazetin um so auffallender, als wir ja hier drei stufenweise verlaufende Hydrolysen haben, welche wohl mit verschiedener Geschwindigkeit stattfinden.

Nicloux hatte bei kleinen Enzymmengen E und Versuchszeiten die gespaltenen Substratmengen den Enzymmengen proportional gefunden. Dies wird durch Messungen von Jalander[1]) bestätigt.

Je 1,0 g Cottonöl, 1 ccm 0,01 n. Essigsäure. Temperatur 22°. Versuchsdauer 30 Minuten (Tab. XX).

Enzymmenge E (Rizinuslipase in Aufschlemmung)	Verbrauchte ccm 0,1 n. Natronlauge	Gespalten, % x	$\frac{x}{E}$
0,001	1,68	4,46	4,46
0,002	3,40	9,04	4,52
0,003	5,21	13,85	4,65
0,004	6,70	17,82	4,45
0,005	8,31	22,10	4,40
0,010	15,63	41,57	4,16
0,015	19,96	53,08	3,54
0,020	22,18	58,99	2,99
0,025	23,05	61,30	2,41

Was den zeitlichen Verlauf der Fettspaltung betrifft, so fand Jalander in der Regel einen befriedigenden Anschluss an die Schützsche Regel, während die Reaktionskoeffizienten erster Ordnung fielen.

Je 0,02 g trockene Rizinuslipase, 1,0 g Triolein, 1,0 ccm 0,01 n. Essigsäure. Temperatur 20°. Nach sorgfältiger Emulsionierung während der ganzen Versuchsdauer maschinell geschüttelt (Tab. XXXIII).

Minuten t	0,1 n. NaOH ccm	% gespalten x	$\frac{x}{\sqrt{t}}$	$\frac{10^4}{t} \lg \frac{a}{a-x}$
10	6,76	20,39	6,4	100
20	11,55	34,87	7,8	93,0
30	15,93	48,05	8,7	93,9
60	18,85	56,86	7,3	60,6
120	26,18	78,97	7,2	56,2
240	28,54	86,54	5,7	35,7

Synthetische Wirkungen.

Taylor[2]), S. Iwanow[3]), Welter[4]), Jalander (l. c.) und Krauss[5]) haben mit Rizinusenzym Synthesen durchführen können, wobei auch die Zwischenprodukte, Mono- und Dioleine, beobachtet wurden (Krauss). Der nachfolgende Versuch von Jalander zeigt, dass von beiden Seiten her die gleiche Gleichgewichtslage erreicht wurde (Vers. 8).

---

1) Jalander, Biochem. Zs 36, 435; 1911.
2) Taylor, Publ. Univ. California I, 33; 1904.
3) Serg. Iwanow, Bot. Ber. 29, 595; 1911.
4) Welter, Zs angew. Chem. 24, 385; 1911.
5) Krauss, Zs angew. Chem. 24, 829; 1911.

Temperatur 20°. 5mal täglich je 2 Minuten lang geschüttelt.

A. Esterspaltung. 0,01 g trockene Rizinuslipase, 1,0 g Triolein, 1 ccm 0,01 n. Essigsäure			B. Esterbildung. 0,01 g trockene Rizinuslipase, 0,957 g Ölsäure, 0,104 g Glyzerin, 1 ccm 0,01 n. Essigsäure		
Dauer Tage	ccm 0,1 n. NaOH	Öl gespalten %	Dauer Tage	ccm 0,1 n. NaOH	Ölsäure geb. %
15	29,51	89,02	15	30,31	11,16
30	29,30	88,37	30	30,35	11,04

Nach Iwanow wirkt das fettspaltende Enzym je nach der Samenreife synthetisierend oder spaltend. Eine Untersuchung, welchen Einfluss hierbei die Azidität des Mediums hat, wäre in hohem Grade wünschenswert.

Auch mit Enzym aus Chelidoniumsamen konnte Bournot (l. c.) Monoolein und Triolein synthetisieren.

Was die Theorie dieses oder ähnlicher enzymatischer Gleichgewichte betrifft, so dürfte es nunmehr eine der nächsten Aufgaben sein, die Grundannahme, daß enzymatische Reaktionen durch die Verbindungen zwischen Enzym und Substrat vermittelt werden, auf umkehrbare Reaktionen mit messbarer Gleichgewichtslage anzuwenden. Offenbar wird, wie ich schon 1907 betont habe[1]), das natürliche Gleichgewicht durch die Verteilung des Enzyms zwischen Substrat und Reaktionsprodukt, im vorliegenden Fall zwischen Ester und Säure bezw. Alkohol, beeinflusst. Zur Klärung dieser Verhältnisse sind weitere experimentelle Daten erforderlich, welche ich bald mitteilen zu können hoffe.

Technische Anwendung.

Die Ausarbeitung der enzymatischen Fettspaltung durch Phytolipasen als technisches Verfahren verdankt man Connstein, Hoyer und Wartenberg. D.R.P. Kl. 23d 145413 und 147757; 1902. Ver. Chem. Werke Charlottenburg.

Die Trennung des Protoplasmas von anderen Bestandteilen des Rizinussamens, Öl und Aleuron, durch Zentrifugieren hat sich Nicloux patentieren lassen D.R.P 188511; 1904. — Ein weiteres Patent von Nicloux, D.R.P. 191113; 1905 betrifft den Zusatz von Kalzium- und Magnesiumsulfat.

Siehe auch das Verfahren von Willstätter (S. 35) D.R.P. 316504 (1919), 3. Beispiel.

C. Esterasen in Pilzen und Mikroorganismen.

Eine Esterase in höheren Pilzen beschreibt Zellner[2]).

In niederen Pilzen sind Esterasen zuerst von Gérard[3]) und Camus[4]) nachgewiesen worden.

---

[1]) Euler, H. 52. 146; 1907.

[2]) Zellner, Monatsh. f. Chem. 27, 295; 1906. — Chemie der höheren Pilze, Leipzig 1907.

[3]) Gérard, C. r. 124, 370; 1897.

[4]) Camus, Soc. Biol. 49, 192; 230; 1897.

Weitere Literatur über Pilzesterasen:

Aspergillus
- Biffen, Ann. of Bot. 13, 163; 1899.
- Garnier, Soc. Biol. 55, 1490, 1583; 1903.
- Spieckermann u. Bremer, Landw. Jahrb. 31, 81; 1902.
- Laxa, Arch. f. Hyg. 41, 119; 1902.

Lactarius sanguifluus
- Rouge, Zbt. f. Bakt. II, 18, 404; 1907.
- Deleano, Biochem. Zs 17, 225; 1909.

Rouge (l. c.) zieht aus seinen Beobachtungen über die Lipase des Lactarius sanguifluus den Schluss, dass in verdünnten Lösungen die Enzymwirkung der angewandten Enzymmenge direkt proportional ist.

Deleano, der mit dem gleichen Pilz gearbeitet hat, nimmt zwei verschiedene Enzyme an, die er mit der Serumesterase und der Pankreasesterase vergleicht. Diese zeigen allerdings, wie aus den früheren Abschnitten zu sehen ist, wenig charakteristische Unterschiede. Der Autor macht auch Angaben über den Einfluss der Temperatur auf diese Enzyme.

In Hefen, welche ja unter geeigneten Bedingungen sehr fettreich werden können, sind vielfach Esterasen nachgewiesen worden.

Neuere Literatur über Fettspaltung durch Bakterien:

Jensen, Zbt. Bakt. II, 8, 11; 1902.
Söhngen, Folia microbiologica I. Chem. Zbt. 82, II, 631; 1911.
Rubner, Arch. f. Hyg. 38, 67; 1900.
Huss, Zbt. Bkt. II, 20; 1908.
Fuhrmann, Bakterienenzyme. Jena 1907.

Bemerkenswert ist die Angabe von Söhngen (l. c.), dass eine aus Bac. fluorescens, pyocyaneus, liquefaciens dargestellte, sehr säureempfindliche Esterase eine 5 Minuten lange Erhitzung auf 100° überdauerte. Dem gleichen Forscher zufolge soll die Bakterienesterase erst in 0,02 n. Milchsäure zu wirken aufhören.

Die lipolytische Wirkung der Fäzes entstammt sicher, wie auch Molnár[1]) annimmt, zum Teil den Bakterien.

D. Methoden zur Messung der Fett- und Esterspaltung.

Die Methoden zur Untersuchung der Fettspaltung gründen sich im wesentlichen auf zweierlei Effekte:

1. Die Bildung freier Säure (und freien Alkohols) aus dem Ester.

2. Die Änderung der Oberflächenspannung der Reaktionsflüssigkeit.

---

[1]) Molnár, D. med. Woch. 43, 326; 1917.

1a. Titrationsmethoden.

Es handelt sich hierbei durchweg um alkalimetrische Titration mit NaOH, zu welcher in der Regel 1%iges Phenolphthalein als Indikator verwendet worden ist.

Soweit niedere Ester, in erster Linie Äthylbutyrat, und einigermassen klare Lösungen von Enzym angewandt worden sind, stimmt die Methodik mehr oder weniger vollständig mit denjenigen überein, welche bei nichtenzymatischen Esterhydrolysen angewandt und mannigfach durchgearbeitet worden sind. Die Anwendung dieser Methodik findet man besonders in den Arbeiten von Kastle und Loevenhart (vergl. S. 27 u. ff.).

Auch wenn es sich um die Spaltung eigentlicher Fette und Öle handelt, so kann die durch die Reaktion gebildete Säure mittels Alkali direkt titriert werden, wie dies in den Arbeiten von Dietz u. a. geschehen ist.

Im allgemeinen wurde zur Herstellung einer homogenen Lösung die Fettemulsion vor der Titration mit Alkohol versetzt[1]. In denjenigen Fällen, in welchen das Enzym in fester bzw. in nicht vollständig gelöster Form zur Anwendung gekommen ist, wie bei den Versuchen von Connstein, Hoyer und Wartenberg (siehe S. 34), liefert nach der Erfahrung dieser Forscher die Titration „niemals zu hohe, eher aber öfter zu niedrige Werte, da es sehr schwer ist, die in dem Samengemenge enthaltende Fettsäure dem ersteren bis auf die letzten Spuren durch Extraktion zu entziehen“.

Beim Arbeiten mit pflanzlichen Lipasen werden die Samen geschält, durch Auspressen und Behandeln des Presskuchens mit Äther von Öl befreit und fein gemahlen. Die gebildete Samenmilch wird in einer Zentrifuge von den unwirksamen Bestandteilen des Samens getrennt. Man lässt sie 24 Stunden stehen, unterdessen sammelt sich die enzymhaltige Emulsion, in welcher sich die zur Aktivierung nötige Säure (Milchsäure) bildet, an der Oberfläche an und kann abgehoben werden. Mit 5—10 g dieser Emulsion verrührt man 100 g Öl und 0,2 g Manganosulfat und entnimmt der Mischung von Zeit zu Zeit Proben zur Titration.

Über die Herstellung von Ölemulsionen siehe auch Jalander (l. c.).

Methode von Volhard-Stade[2].

Volhard und seine Schüler verwenden als Substrat Eigelbemulsion. Die Titration nehmen sie nicht direkt mit einem aliquoten Teil des Reaktionsgemisches vor, sondern sie schütteln dieses, bzw. einen Teil desselben, mit Äther und etwas Alkohol aus und titrieren einen gemessenen Teil des Ätherextraktes mit Natronlauge. Die Methode stellt sich also folgendermassen:

[1] Siehe z. B. Kanitz, Chem. Ber. 36, 400; 1903. — H. 46, 482; 1905. — Terroine Biochem. Zs 23, 404; 1910.

[2] Stade, Hofm. Beitr. 3, 291; 1903.

Gleiche Mengen des Verdauungsgemisches werden in 100—150 ccm fassende Flaschen gebracht, mit 75 ccm Äther, zur Beschleunigung der Schichtung unter Zusatz von Alkohol[1]) übergossen und, gut verkorkt, gleich lang maschinell geschüttelt.

Sobald sich nach Beendigung des Schüttelns der Äther von dem Verdauungsgemisch getrennt und geklärt hat, werden 50 ccm desselben in ein Kölbchen abgegossen, mit 75 ccm neutralisierten Alkohols versetzt und mit wässeriger 0,1 n. NaOH titriert. Bestimmung I.

Zur Ermittelung der Totalmenge des anwesenden verseifbaren Fettes werden nun 10 ccm 1 n. Natronlauge zugegeben und die Kölbchen 24 Stunden unter dem Rückflusskühler verseift. Die aus den Neutralfetten so gebildeten Seifen werden durch 10 ccm 1 n. H_2SO_4 gespalten, wobei gleichzeitig das überschüssige Alkali gebunden wird, und durch eine zweite Titration die Neutralfette als Fettsäuren bestimmt. Bestimmung II.

Die Berechnung geschieht nach der Formel $I : I + II = x : 100$.

Verwendet man nicht Eigelbemulsion, sondern Fett- bzw. Ölemulsion, so ist die Wahl des Öles und die Herstellung der Emulsion wesentlich für den Verlauf der Spaltung. Umeda[2]) empfiehlt Arachis-Öl und gibt eine Methode zur Herstellung einer gleichmässigen Emulsion an.

Bei Zusatz von Bikarbonat zur Reaktionslösung lassen sich die abgespaltenen Fettsäuren nicht direkt titrieren. Die Methode von Abderhalden und Weil[3]) umgeht diese Schwierigkeit, indem nach Beendigung des Versuches und Abkühlen auf etwa 10° von dem Pankreasgewebe, dem nicht gespaltenen Fett und dem unlöslichen Natriumstearat abfiltriert und das dem anfangs zugesetzten Bikarbonat entsprechende Volumen n/10 Schwefelsäure hinzugefügt wird. Durch kurzes Aufkochen am Rückflusskühler wurde die frei gewordene Kohlensäure entfernt. Die nach dem schnellen Abkühlen auf Zimmertemperatur und Zusatz von drei Tropfen 1proz. Phenolphthaleinlösung bis zur schwach rosa Färbung verbrauchte Menge n/10 NaOH entsprach dann der aus dem Fett abgespaltenen Menge Säure. Stearinsäure wurde noch direkt als Bleistearat bestimmt.

Eine vereinfachte Methode, die Lipasen im Duodenalinhalt zu bestimmen, welche vielleicht zu klinischen Zwecken ausreichend ist, beschreiben Bondi u. Volk (Wien. klin. Woch. 32, 141; 1919).

Mauban verwendet zur Bestimmung des durch direkte Duodenalsondierung gewonnenen Pankreassaftes Fettgelatineplatten (Soc. Biol. 83, 130; 1920).

1b. Bestimmung des gebildeten Glyzerins.

St. v. Pesthy[4]) hat bei seinen Versuchen, die mit Magen- und Pankreasenzym und mit Eigelb oder Olivenöl als Substrat angestellt wurden, sowohl die entstehenden Säuren titriert als auch das Glyzerin nach Zeisel-Fanto bestimmt.

[1]) Siehe hierzu Engel, Hofm. Beitr. 7, 77; 1905.
[2]) Umeda, Biochem. Jl 9, 38; 1915.
[3]) Abderhalden und Weil, Fermentf. 4, 86; 1920.
[4]) v. Pesthy, Biochem. Zs. 34, 147; 1911.

Die Reaktionsflüssigkeit wurde verdünnt, mit Essigsäure angesäuert und mit einer 10%igen Lösung von Phosphorwolframsäure im Überschuss versetzt. Der hierbei entstandene Niederschlag besteht aus gefälltem Eiweiss, das auch die Fette der Emulsion mit sich reisst. Die Flüssigkeit wird auf einer Nutsche abgesaugt; es wird mit dest. Wasser gewaschen, aus dem opalisierenden Filtrat die Phosphorwolframsäure mit Baryt gefällt, filtriert und im Filtrat der überschüssige Baryt durch CO_2 entfernt. Aus dem nunmehr barytfreien Filtrat werden die Chloride durch frisch gefälltes Silberoxyd gefällt und durch Filtration entfernt. Im eingeengten Filtrat wird nunmehr das Glyzerin nach Zeisel und Fanto bestimmt[1]). Die Methode besteht bekanntlich darin, dass die Glyzerin enthaltende Lösung, mit JH gekocht, flüchtiges Isopropyljodid gibt, das, in eine alkoholische Lösung von $AgNO_3$ geleitet, dort einen Niederschlag von AgJ bildet, welcher zur Wägung gebracht und auf Glyzerin berechnet wird.

2. Stalagmometrische Methode.

Die Titrationsmethoden zur Messung der Fettspaltung sind von Saxl[2]) einer, allerdings übertrieben, abfälligen Kritik unterzogen worden, mit dem Resultat, dass „keine der bisher empfohlenen Methoden ein quantitatives Studium der Esterspaltung gestattet, da die gewonnenen Werte entweder bei kurzer Versuchsdauer so gering sind, dass sie kaum ausserhalb der Fehlergrenzen liegen, oder aber bei langer Versuchsdauer durch die mit den Bestimmungsmethoden verbundenen Fehlerquellen getrübt werden.“

Rona und Michaelis[3]) haben zur Vermeidung dieses Übelstandes eine Methode ausgearbeitet, bei welcher sie Äthylbutyrat als Substrat verwenden und den Gang der Reaktion durch die Änderung der Oberflächenspannung verfolgen, welche infolge der Esterspaltung eintritt. Diese Methode ist nur unter Verwendung echter Lösungen, also niederer Ester, anwendbar; bei Verwendung von Fettemulsionen dürfte eine stalagmometrische Methode, wie sie Izar (Biochem. Zs 40, 390; 1912) vorgeschlagen hat, nicht brauchbar sein.

Die Glyzerinester erniedrigen die Oberflächenspannung des Wassers selbst in geringen Konzentrationen bedeutend, während die Spaltprodukte auf die Oberflächenspannung eine verhältnismässig geringe Wirkung ausüben. Die äusserst geringen Mengen Tributyrin, welche in wässerige Lösung gehen, genügen schon, um die Oberflächenspannung des Wassers stark zu erniedrigen.

Als Messapparat eignet sich ein Traubesches Stalagmometer, mit welchem die Tropfenzahl ermittelt wird, die beim Entleeren eines bestimmten Volumens der Flüssigkeit gebildet wird; diese Tropfenzahl ist ein Mass der relativen Oberflächenspannung.

Die Methode von Rona und Michaelis ist bald von Davidsohn[4]) in etwas abgeänderter Form angewandt worden.

[1]) Zeisel u. Fanto, Zs f. anal. Chem. 42, 549; 1903.

[2]) Saxl, Biochem. Zs 12, 343; 1908. Siehe auch Freudenberg, Biochem. Zs. 45, 469.

[3]) Rona u. Michaelis, Biochem. Zs 31, 345; 1911. — Rona, Biochem. Zs. 32, 482; 1911.

[4]) Davidsohn, Berl. klin. Woch. 49, 1132; 1912.

Davidsohn verfährt zur Bestimmung der fettspaltenden Wirkung des Magensaftes folgendermassen:

Der nach Probefrühstück gewonnene und filtrierte Mageninhalt wird 2-, 4- und 8fach verdünnt. Von diesen Verdünnungen und eventuell dem unverdünnten Saft werden 0,5 bzw. 0,75 und 1,0 ccm mit 60 ccm einer gesättigten wässerigen Tributyrinlösung versetzt. Es empfiehlt sich zunächst, 4 Verdünnungen mit je 4 bis 5 Minuten Zwischenraum anzusetzen. Das Intervall genügt zu einer Messung und nach 60 Minuten sieht man, ob man weiter stärkere oder schwächere Verdünnungen wählen muss. Eine Sättigung der Lösung mit Tributyrin tritt erst allmählich und nach kräftigem Schütteln mit einem grossen Überschuss Tributyrin ein. Es muss jede neue Lösung auf ihren richtigen Gehalt mit der Tropfmethode geprüft werden. Für gleiche Temperatur der verwendeten Flüssigkeiten ist zu sorgen. Die optimale Azidität wird durch einen Zusatz von 0,5 ccm $^1/_3$ n. H_2KPO_4 und 0,5 ccm $^1/_3$ n. HNa_2PO_4 hergestellt.

Sofort nach dem Vermischen der Tributyrinlösung mit dem Magensaft, und dann stets nach 20 Minuten, werden Proben abgefüllt und gemessen. Die von Davidsohn benutzte Kapillare war so beschaffen, dass der Wert für die Tributyrinlösung 144, für reines Wasser 94 Tropfen betrug. Die Spaltung der Tributyrinlösung durch Magensaft geht nun so vor sich, dass zunächst bis zu einem Wert von etwa 110 Tropfen eine schnelle Änderung eintritt, die dann asymptotisch bis ungefähr 100 Tropfen weiter verläuft.

Die Kapillare ist vor jedem Versuch mit einer kleinen Menge der zu prüfenden Flüssigkeit zu waschen.

Eine Methode zum schnellen Nachweis von Esterasen, besonders Phenolesterasen, die sich auf die Anwendung von Guajakolkarbonat gründet, hat A. Bach[1]) angegeben.

Anhang. Besondere esterspaltende Enzyme.

1. Lezithase.

Die Existenz eines besonderen Enzyms, welches Lezithin,

$$\begin{array}{l} \qquad\quad /OH \\ CH_2OPO - OCH_2 \cdot CH_3 \cdot N(CH_3)_3OH \\ | \\ CHOR \\ | \\ CH_2OR \end{array}$$

(R = Palmitin-, Stearin- oder Ölsäure.)

sowie Derivate desselben und eventuell andere Phosphatide) hydrolytisch spaltet, wurde von Cohnstein und Michaelis (1894), von Hamburger (1900) und neuerdings von F. H. Thiele[2]) behauptet, welche dieses Enzym

[1]) A. Bach, Fermentforschung 1, 151; 1915.

[2]) F. H. Thiele, Biochem. Jl 7, 275; 1913.

im Blut und Chylus fanden. Im normalen Serum soll sich diese Lezithase nicht finden, sondern an die geformten Elemente des Blutes (nicht an das Hämoglobin) gebunden sein, wie dies auch bei der Esterase des Blutes der Fall ist (vergl. S. 31).

Lezithin wird von Enzymen des Magens[1], des Pankreas[2] und des Darmes[3] kräftig angegriffen, auch von einem Enzym der Leber[4], der Lunge Fr. Müller) und anderer Organe, ferner im Dotter des Hühnereis[5].

Im Gegensatz zu P. Mayer und zu Wohlgemuth konnten Stassano und Billon[6], sowie auch Kalaboukoff und Terroine[7] keine Lezithinspaltung durch den Pankreassaft nachweisen.

Von besonderem Interesse ist die von Neuberg[8] entdeckte enzymatische Lezithinspaltung durch eine Reihe natürlich vorkommender Hämolysine und Agglutinine. Dass nach Neuberg und K. Reicher[9] für Magen- und Pankreassaft ein Parallelismus zwischen Hämolyse und Fettspaltung besteht, ist schon S. 20 erwähnt worden; das gleiche gilt auch für bakterizide, antitoxische, zytolytische und bakteriolytische Sera[10].

Auch Bergel[11] vertritt die Auffassung, dass die Hämolyse durch die Auflösung und Spaltung der Membranlipoide veranlasst wird.

Olsen und Goette[12], welche in letzter Zeit die Serumhämolyse und -lipolyse verglichen haben, kommen zur Auffassung, dass „das unter den verschiedensten Bedingungen übereinstimmende Verhalten zum mindesten sehr für einen weitgehenden Parallelismus dieser Serumwirkungen spricht".

Fiessinger und Clogne[13] nehmen in den Leukozythen neben der eigentlichen Lipase noch eine Lezithinase (Lipoidase) an, indem sie angeben, dass letzteres Enzym erheblich thermolabiler ist als die Lipase; es wird durch halbstündiges Erhitzen auf 56°—60° zerstört. Die Reaktion dieser Lezithinase wird deutlich, „wenn 2—4 Millionen Leukozythen auf 1 ccm 1/100 Lezithin-

[1] Schumoff-Simanowski u. Sieber, H. 49, 50; 1906. — Usuki, Arch. f. exp. Path. 63, 270; 1910.

[2] Paul Mayer, Biochem. Zs 1, 39; 1906. — Clementi, Arch. di Fisiol. 8, 399; 1910. — Wohlgemuth, Biochem. Zs 39, 302; 1912.

[3] Brugsch u. Masuda, Zs exp. Path. 8, 617; 1911. — Ugo Lombroso, Arch. di Farmac. sper. 13, 73; 1912.

[4] Waldvogel, H. 42, 200; 1904.

[5] Wohlgemuth, H. 44, 540; 1905.

[6] Stassano u. Billon, Soc. Biol. 55, 482; 1903.

[7] Kalaboukoff u. Terroine, Soc. Biol. 66, 176; 1909.

[8] Neuberg u. E. Rosenberg, Berl. klin. Woch. 44, 54; 1907.

[9] Neuberg u. Reicher, Biochem. Zs 4, 281; 1907. — Münch. med. Woch. 54, 1907.

[10] Siehe auch Rosenheim, Proc. Physiol. Soc., Jl of Physiol. 40, VIII; 1910.

[11] Bergel, D. med. Woch. 34, 1908, D. Arch. klin. Med. 106, 47; 1912. — Zs Immun. 13, 255; 1912 u. 27, 441; 1918.

[12] Olsen und Goette, Biochem. Zs. 112, 188; 1920.

[13] Fiessinger u. Clogne, C. r. 165, 730; 1917.

lösung 10 Tage wirken". Das Optimum der Lezithinspaltung soll in schwach alkalischer Lösung eintreten.

2. Cholesterase.

Dass Ester des Cholesterins durch ein in Leber, Niere und Milz enthaltenes Enzym gespalten werden, hat zuerst Kenro Kondo[1]) gezeigt. Cytronberg[2]) fand ein entsprechendes Enzym auch im Blut. Seine Methodik gründet sich auf die Fällung des Cholesterins durch Digitonin nach Windaus.

In Organen und Geweben, welche Cholesterylester enthalten, hat man auch ein entsprechendes Enzym gefunden. Dagegen besitzt Hirn, welches zwar Cholesterin aber keinen Cholesterinester enthält, keine Cholesterase (Lorrain, Smith und Mair[3]).

Eine sichere Abgrenzung dieses Enzyms von den in den Organen gleichzeitig auftretenden oben behandelten Esterasen liegt noch nicht vor.

Ob ein von anderen Esterasen verschiedenes wachsspaltendes Enzym in den Lymphozyten vorkommt, wie durch Ergebnisse von Bergel[4]) wahrscheinlich wird, bleibt weiteren Untersuchungen zur Entscheidung vorbehalten.

A. E. Porter[5]) fand allerdings ziemlich weitgehende Unterschiede zwischen Lipasen (Esterasen) und dem Enzym, welches die Ester höherer Alkohole (Lanolin, Cholesteryl-Palmitat, Cetylpalmitat u. a.) spaltet, und welches sich neben Butyrasen und Lezithinase in zahlreichen tierischen Organen findet.

Dieses Vorkommen einer Cholesterase wäre bemerkenswert, weil die Tuberkelbazillen eine wachsähnliche Substanz enthalten. Nach Porter (l. c.) scheint die Resistenz verschiedener Organe mit ihrem Gehalt an Esterasen in Beziehung zu stehen. So sind die Organe der Katze, welche wenig empfänglich für Tuberkeln ist, durchweg reich an Esterasen. Andererseits ist bei allen Tierarten die Lunge sehr esterasearm.

Aus der gegen Tuberkelbazillen immunen Raupe der Wachsmotte lässt sich nach Fissinger[6]) ein wachsspaltendes Enzym extrahieren.

3. Chlorophyllase.

Dieses von Willstätter und Stoll[7]) entdeckte Enzym spaltet aus dem Chlorophyll den charakteristischen Alkohol, Phytol, ab, wobei, je nach dem

---

1) Kenro Kondo, Biochem. Zs 26, 243 u. 27, 427; 1910.

2) Cytronberg, Biochem. Zs 45, 281; 1912. — Siehe auch J. H. Schultz, ebenda 42, 255; 1912.

3) Lorrain, Smith und Mair, Jl Path. Bact. 16, 131; 1912.

4) Bergel, Münch. med. Woch. 66, 929; 1919.

5) Porter, Münch. med. Woch. 61, 1775; 1914. — Biochem. Jl 10, 523; 1916.

6) Fiessinger, Soc. Biol. 83, 147; 1920.

7) Willstätter u. Stoll, Lieb. Ann. 378, 18; 1911. — Siehe auch Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin 1913.

Lösungsmittel, die betreffende Karboxylgruppe frei oder mit Äthyl- bzw. Methylalkohol wieder verestert wird, entsprechend den Formelgleichungen:

1. $[C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_{20}H_{39}) + H_2O$
Chlorophyll a
$= [C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(COOH) + C_{20}H_{39}OH$
Chlorophyllid a Phytol

2. $[C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_{20}H_{39}) + C_2H_5OH$
Chlorophyll a
$= [C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_2H_5) + C_{20}H_{39}OH$
Äthylchlorophyllid a Phytol

Die Chlorophyllase konnte in allen untersuchten Pflanzenklassen nachgewiesen werden. Als Material für die präparative Anwendung des Enzyms eignen sich aber nur wenige Pflanzen; besonders gut:

Heracleum spondylium, Galeopsis tetrahit, Stachys silvatica;

anwendbar sind auch:

Lamium maculatum, Datura stramonium und Melittis melissophyllum.

Sehr arm an Chlorophyllase sind: Gras, Platane, Brennessel.

Zwecks Alkoholyse und Hydrolyse durch Chlorophyllase ist die möglichst frische, ungetrocknete Blattsubstanz mit dem sich bildenden oder frisch gebildeten Extrakt in Berührung gebracht worden. Indessen erfordert die Verarbeitung der ungetrockneten Blätter infolge ihres Wassergehaltes ausserordentlich viel Lösungsmittel.

Daher ist oft die Verwendung des Mehles der getrockneten Blätter vorzuziehen. Die Trocknung soll rasch erfolgen, in 1—2 Tagen, in dünn ausgebreiteter Schicht bei Temperaturen von höchstens 40° und unter Vermeidung von Sonnenlicht.

Die enzymatische Wirksamkeit der geeignetsten Pflanzen leidet erst bei längerem Aufbewahren des getrockneten Blattmehles; drei Jahre alte Galeopsis- oder Heracleumblätter zeigten noch 1/4 von der Wirksamkeit des frischen Vergleichsmateriales.

Zu kinetischen Versuchen ist als Chlorophyllase das Mehl der bei Zimmertemperatur getrockneten Blätter nach zuerst raschem, dann erschöpfendem Extrahieren des Chlorophylls mit 96%igem Alkohol verwendet worden, mitunter auch einfach das Blattmehl ohne Vorbehandlung.

Die Menge des Enzyms bezeichnet Willstätter „mit dem Bruchteil des Pflanzenmehles, welches dem Chlorophyllgehalt des bei dem Versuche angewandten Extraktes entspricht“ (vergl. hierzu l. c. S. 179).

Besonders bemerkenswert ist der Umstand, dass Chlorophyllase noch in hochprozentigen Alkohollösungen und in Gegenwart von viel Azeton wirkungsfähig ist.

sauren Natur der freien Chlorophyllide beruht; diese können nämlich aus der ätherischen Lösung mit verdünntem KOH ausgezogen werden; die alkalischen Auszüge werden mit Methylalkohol auf ein bestimmtes Volumen gebracht. In einer zweiten Probe wird das im Äther zurückgebliebene Chlorophyll mit methylalkoholischem Kali verseift und in gleicher Weise wie oben verdünnt. Die beiden Lösungen werden im Kolorimeter verglichen. Fehler ± 2 — 3 %.

2. Die Alkoholyse kann an dem schwerlöslichen Chlorophyllderivat, das aus der alkoholischen Lösung durch Einwirkung von Oxalsäure abgeschieden wird, ermittelt werden

a) durch Bestimmung der Phytolzahl, d. h. des Phytolgehaltes in Prozenten[1]). Diese geschieht durch Verseifung mit methylalkoholischer Kalilauge und darauffolgender 5—6 maliger Extraktion des Phytols mit Äther. Aus der mit Wasser gewaschenen, getrockneten, hierauf mit Tierkohle behandelten ätherischen Lösung wird unter besonderen Vorsichtsmassregeln der Äther abdestilliert, worauf das Phytol zur Wägung gebracht wird.

b) durch quantitative Abspaltung der Methyl- und Äthylgruppe mit Jodwasserstoff nach dem Verfahren von Zeisel.

Chlorophyll und Phäophytin enthalten ein Methoxyl und nehmen in alkoholischer Lösung unter Einwirkung der Chlorophyllase eine Äthoxylgruppe auf. Da in den teilweise umgewandelten Präparaten also sowohl Methoxyl- als Äthoxylgruppen vorhanden sind, ist es nicht zweckmässig, diese anzugeben, sondern Willstätter führt die „Jodsilberzahl" ein:

$$\text{Jodsilberzahl} = \frac{\text{gefundenes AgJ}}{\text{angewandte Substanz}} \cdot 100.$$

Aus den Jodsilberzahlen lässt sich die prozentische Menge umgewandelten Chlorophylls nach Formeln berechnen, welche Willstätter und Stoll[1]) angegeben und geprüft haben.

[1]) Willstätter, Hocheder u. Hug, Lieb. Ann. 371, 18, 1909 und 378, 31; 1910. — Monographie S. 308 u. 181.

2. Kapitel.

Phosphatasen.

„Phosphatasen" ist die regelrecht gebildete Bezeichnung für diejenigen Enzyme, welche organische Phosphate (Phosphorsäureester organischer Alkohole oder Alkoholderivate) spalten. Der Wirkungsbereich der verschiedenen Enzympräparate ist experimentell noch nicht genügend abgegrenzt, man muss also einstweilen die Wirkungen auf die einzelnen Phosphorsäureester getrennt behandeln. Die wichtigsten dieser Ester dürften die

Kohlehydratphosphorsäuren sein, deren Katalysatoren demgemäss zuerst besprochen werden. An die Derivate der eigentlichen Kohlenhydrate schliesst sich die

Glyzerinphosphorsäure als Bestandteil des Lecithins an.

Schliesslich spielt die

Inositphosphorsäure (Phytin) eine biochemische Rolle.

A. Kohlehydratphosphatasen.

Unter den Substraten der Kohlehydratphosphatasen haben wir zu unterscheiden

das Zymophosphat bzw. Fruktosediphosphat,

andere Zuckerphosphate, besonders Saccharosephosphat,

die Amylosephosphate.

die Nukleotide,

1. Die Zymophosphatase.

Das Vorkommen eines besonderen, den Fruktosediphosphorsäureester spaltenden Enzymes in der Hefe ist von Harden und Young[2]) entdeckt

[1]) Willstätter u. Stoll, Lieb. Ann. 378, 34; 1910. — Monographie S. 182.

[2]) Harden u. Young, Proc. Roy. Soc. 82, 327; 1910.

worden, nachdem Iwanoff[1]) gefunden hatte, dass Zymophosphat von Zymin vergoren wird.

Die Reaktion, welche durch die Zymophosphatase ausgelöst wird, muss nach Harden und Young folgendermassen formuliert werden:

$$C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2PO_4HR_2.$$

Auf die Rolle, welche dieses Enzym bei der alkoholischen Gärung spielt, kommen wir bei der Behandlung der Gärungsenzyme noch zurück.

Das Vorkommen der Zymophosphatase beschränkt sich nicht auf die Hefen[2]). Da sich die Hefenzymophosphatase aus dem Hefenpresssaft noch nicht hat isolieren lassen, so war es wünschenswert, ein anderes an Phosphatase reiches Material zu finden. Die ersten Versuche in dieser Hinsicht sind von Euler und Funke[3]) gemacht worden. Äusserst geringe Wirkung wurde erhalten mit:

10% Pepsin (Puriss. Merck), Pankreatin (Rhenania), Darmextrakt eines Kaninchens, defibriniertem Blut, Nierenmazeration von Kaninchen[3]).

Eine Fortsetzung dieser Versuche durch Euler, Thorin u. Johansson[4]) ergab einen stärker positiven Erfolg mit:

Darmschleimhaut von Schwein und Pferdenieren.

Die Versuche waren unter möglichst peinlicher Einhaltung aseptischer Bedingungen und unter Zusatz von Toluol ausgeführt. Beispiel:

25 ccm Extrakt von Pferdenieren und 25 ccm 5%ige Lösung des Natriumzymophosphats wurden gemischt und mit 0,5 ccm Toluol versetzt. Der Lösung wurden von Zeit zu Zeit Proben entnommen, welche die folgenden Zahlen ergaben:

Stunden	0	2	15	24	∞
in 10 ccm g $Mg_2P_2O_7$	0	0,0016	0,0054	0,0144	0,1321

Harding[5]) fand bald darauf autolysierten Ochsenpankreas fast wirkungslos gegenüber Zymophosphat. Erfolgreicher war eine Untersuchung von Plimmer[6]), welcher eine ziemlich weitgehende Spaltung durch Katzendarmextrakt erhielt, während Versuche mit Pankreas und Leber keine Spaltung ergaben. Plimmer hat seine verschiedenen Enzympräparate gleichzeitig auch an anderen Phosphaten geprüft. Seine zusammenfassende Tabelle wird hier vollständig mitgeteilt:

[1]) Iwanoff, Zblt. f. Bakt. 2, 24, 1; 1909.

[2]) Von anderen Mikroorganismen ist in bezug auf Zymophosphatase bis jetzt nur Bacterium coli untersucht worden. Diese Bakterien zeigten eine beträchtliche Spaltungsfähigkeit gegenüber Zymophosphat. Hans u. Beth Euler, H. 92, 292; 1914. Auch mit Aspergillus niger hat Verf. eine Spaltung erzielt.

[3]) Euler u. Funke, H. 77, 488; 1912.

[4]) Euler, Thorin, Johansson, H. 79, 375; 1912.

[5]) Harding; Proc. Roy. Soc. 85, 418; 1912.

[6]) Plimmer, Biochem. Jl 7, 43; 1913.

	Pankreas	Leber	Darm	Rizinus-samen	Trockenhefe Zymin	Kle
Hexose-(Zymo-)phosphat	0	...	+	+	+	+
Glyzerophosphat	0	...	+	+	+	+
Äthylphosphat	0	...	+	+	+	+
Diäthylphosphat	...	...	0	0	...	...
Phytin	0	0	0	+	0	+
Thymusnukleinat	0	...	+	...	+?	+
Weizennukleinat	...	...	+?	...	...	...
Fleischnukleinat	0	...	+	...	...	...
Hydroxymethylphosphat	0	...	0	0	+?	0
Phosphoprotein	$^2/_3$	...	+	...	0	0

Zymophosphat wird also im Darm gespalten. Versuche mit Hunden haben gezeigt, dass das z. T. resorbierte Zymophosphat den Körper zum grössten Teil oder vollständig als anorganisches Phosphat verlässt[1].

Ein Zymophosphat spaltendes Enzym wurde auch in höheren Pflanzen gefunden, zunächst von Euler und Kullberg[2]) in Hafer, dann von Harding (l. c.) in Rizinussamen und Mandelemulsin; von Plimmer (l. c.) in Kleie und von H. und B. Euler[3]) in Ahornblättern. In Gerstenkörnern beobachteten wir[3]) ein starkes Ansteigen der Phosphatasewirkung während der Keimung, und zwar bis zu einem nach etwa 4 Tagen eintretenden Maximum.

Die physikalischen und chemischen Einflüsse auf die Wirkung der Zymophosphatase müssen erst durch eingehendere Versuche sichergestellt werden

Der Umstand, dass Zymophosphat durch lebende Hefe nicht vergoren wird (Iwanoff, Harden und Young, Euler), während Trockenhefe und Hefepresssaft dazu imstande sind (Harden und Young[4])) ist um so auffallender, als einerseits nach Paine[5]) lebende Hefezellen für Natriumzymophosphat wenigstens teilweise permeabel sind, und andererseits Verf.[6]) die von Harden und Young[7]) bestätigte Beobachtung gemacht hat, dass die Zuckervergärung lebender Hefe durch Zymophosphat beschleunigt wird, ohne dass dieses selbst verbraucht wird.

Zymophosphatase scheint in ihrer Wirkung durch manche Antiseptika geschwächt zu werden.

Überschüssiges Phosphat beeinflusst stark den enzymatischen Phosphatumsatz[8]). Inwieweit bei den diesbezüglich bis jetzt vorliegenden Versuchen das Phosphat als Spaltprodukt der Hydrolyse dem weiteren Fortschreiten dieses Vorganges nach dem Massenwirkungsgesetz entgegenwirkt und inwie-

[1]) Euler, Thorin, Johansson, H. 79, 375; 1912.
[2]) Euler u. Kullberg, H. 74, 26; 1911.
[3]) H. u. B. Euler, H. 92, 294; 1914.
[4]) Harden u. Young, Proc. Roy. Soc. B 77, 405; 1906.
[5]) Paine, Proc. Roy. Soc. B 84, 289; 1911.
[6]) Euler u. Bäckström, H. 77, 394; 1912.
[7]) Harden, Alcoholic Fermentation, 2. Aufl., S. 130, 1914.
[8]) Harden u. Young, Proc. Roy. Soc. B 80, 299; 1908.

weit bei diesen Versuchen die sekundären Phosphate nur die Alkalinität der Reaktionslösung vergrössern, lässt sich noch nicht sagen, da über die Aziditätsbedingungen der Zymophosphatase noch keine quantitativen Messungen vorliegen.

Enzymatische Synthese von Zymophosphat. Phosphatese.

Nach den ausserordentlich interessanten Entdeckungen von Harden und Young über die Rolle der Phosphate bei der alkoholischen Gärung[1]) ist die Bildung des Zymophosphates, $C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2$ mit dem ganzen Gärvorgang eng verknüpft. Diese enzymatische Synthese in der Hefe wird demgemäss in Zusammenhang mit den übrigen an der alkoholischen Gärung beteiligten Vorgängen besprochen. An dieser Stelle sei nur folgendes hervorgehoben: Die einfachste Annahme könnte diejenige erscheinen, dass die genannte Synthese die Umkehrung derjenigen Reaktion ist, welche durch die Zymophosphatase beschleunigt wird, dass also auch die Synthese durch die Zymophosphatase katalysiert wird, wenn die geeigneten Reaktionsbedingungen vorhanden sind. Einer solchen Annahme schienen aber folgende Tatsachen entgegenzustehen:

Das spezifische Substrat der Zymophosphatase wird in Fruktose und Phosphorsäure gespalten und ist als Fruktosediphosphat anzusprechen. Als Ausgangsmaterial zur Bildung des Zymophosphates sind sämtliche Zymohexosen geeignet, aber die Bindung zwischen Glukose usw. an Phosphorsäure geschieht offenbar nicht direkt, sondern erst nach einer Umwandlung der Hexose. Der Katalysator der Synthese ist von der eigentlichen Zymase (im engeren Sinne) nur schwer abzuscheiden; vielleicht ist dies überhaupt nicht in allen Heferassen möglich; jedenfalls halten Harden und Young die enzymatische Synthese von Zymophosphat untrennbar mit der alkoholischen Gärung verknüpft, was die englischen Forscher durch die Gleichung zum Ausdruck bringen:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,PO_4HR_2 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_5OH + 2\,H_2O + C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2.$$

Aus der unterhalb 50° getrockneten Stockholmer Unterhefe H konnte ein Extrakt gewonnen werden, welcher die Fähigkeit besass, die Synthese zwischen vorbehandelter Glukose oder Fruktose zu vermitteln, welcher aber Zymophosphat nicht spaltete[2]). Diese Tatsache beweist, dass die Bildung von Zymophosphat keine einfache Umkehrung der Spaltung ist, sondern dass mit der enzymatischen Bindung der Phosphorsäure wenigstens noch eine andere Enzymwirkung, und zwar die Umwandlung der Hexosen, verknüpft sein muss.

Für den bei der Synthese des Zymophosphates wirksamen Stoff hat Verf. 1911 die Bezeichnung „Phosphatese“ vorgeschlagen[3]). Es ist schon

[1]) Harden u. Young, Proc. Roy. Soc. B 77, 405; 1906.
[2]) Euler u. Kullberg, H. 74, 15; 1911.
[3]) Euler, H. 74, 13; 1911.

auf S. 3 betont worden, dass mit diesem Vorschlag über die Beziehung zwischen diesem Enzym und der „Zymophosphatase" nichts ausgesagt werden soll[1]).

Man wird sich natürlich sofort fragen, wie sich die Annahme einer „Phosphatese" und einer „Phosphatase" mit dem Massenwirkungsgesetz vereinbaren lässt. Zunächst ist hierzu nochmals zu betonen, dass das Reaktionsprodukt der Spaltung nicht identisch ist mit dem Substrat der Synthese, selbst wenn Zymophosphat aus Fruktose hergestellt wird, denn dieses muss zunächst umgewandelt werden. Zweitens aber dürfte die Phosphatbindung keine einfache ideale Katalyse darstellen, sondern einen Teil einer gekoppelten Reaktion (vergl. Bd. I, S. 131). Leider ist die Verbrennungswärme des Zymophosphates noch nicht gemessen, so dass die Energiewandlung beim Phosphatumsatz noch unklar ist.

Zymophosphatbildung und -spaltung können auch in nächstem Zusammenhang zueinander stehen; besonders ist der Einfluss der Azidität auf die Zymophosphatbildung und -spaltung noch näher zu prüfen, ebenso die Mitwirkung des Hardenschen Co-Enzyms und nahestehender Aktivatoren auf den Phosphatumsatz.

Die Zymophosphatbildung erreicht nach neuen Messungen von F. Nordlund ihre grösste Wirksamkeit in ganz schwach saurer Lösung (pH = 6,5).

Zwischen 20° und 30° ist der Temperaturkoeffizient der Synthese 1,75 (Euler und Kullberg).

Die Wirksamkeit der aus Unterhefe H abgeschiedenen Phosphatese wird durch Erhitzen des Extraktes auf Temperaturen zwischen 30° und 40° in hohem Grade gesteigert[2]). Halbstündiges Erhitzen auf 60° vermindert die Reaktionsgeschwindigkeit auf etwa 1/9 ihres ursprünglichen Wertes.

Die grössten Unsicherheiten in bezug auf die Esterbildung liegen, wie schon 1911 betont wurde, darin, dass die Natur desjenigen Stoffes oder derjenigen Stoffe, welche mit dem Phosphat reagieren, noch unbekannt ist[3]).

Dass der Einfluss der Phosphate auf die alkoholische Gärung nicht nur ihrem Grade, sondern auch dem Sinne nach von der Azidität bezw. Alkalinität der Lösung abhängt, wurde zuerst von Euler und Tholin[4]) betont.

Methodik der Bestimmung organischer Phosphate s. S. 64.

[1]) Die Abscheidung der Phosphatese ist bis jetzt nur aus getrockneten Hefen gelungen. Es ist wohl möglich, dass in der lebenden Hefe die Phosphatese mit anderen Gärungsenzymen in der Weise verknüpft ist, wie es die Hardensche Gärungsgleichung fordert.

[2]) Euler u. Ohlsén, Biochem. Zs 37, 313; 1911.

[3]) Negative Resultate wurden von mir und Kullberg 1911 erhalten mit Inosit, Glyzerin, Mannit und Alanin. Die Anzeichen für eine Bindung von Arabinose (l. c. S. 22) haben sich später nicht bestätigt.

[4]) Euler u. Tholin, H. 97, 269; 1916.

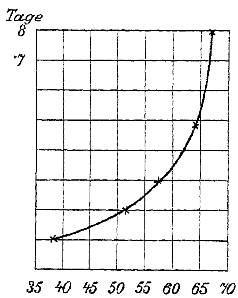
2. Saccharophosphatase.

Das Substrat dieses Enzyms sind die Salze der von Neuberg und Pollak[1]) dargestellten Saccharomonophosphorsäure, $C_{12}H_{21}O_{10} \cdot O \cdot PO_3R_2$ (Hesperonal-Calcium bezw. -Natrium, Merck). Durch Säuren wird auch dieser Phosphorsäureester nur langsam gespalten.

Die enzymatische Hydrolyse wird durch lebende Hefe oder, analog wie die des Zymophosphates, durch Hefenmazerationssaft bewirkt[2]); indessen bleibt es erst der späteren Forschung vorbehalten, zu entscheiden, ob wirklich neben der Zymophosphatase noch eine besondere Saccharophosphatase angenommen werden muss[3]).

Nach Djenab und Neuberg ist ihre Phosphatase sowohl in schwach essigsaurer Lösung als in neutraler und schwach alkalischer Lösung wirksam. Toluol schädigt nicht.

Folgender Versuch gibt eine Vorstellung vom zeitlichen Verlauf der Reaktion.



Abgespaltenes P_2O_5 in %.
Fig. 5.

20 g Na-Saccharophosphat (schwach alkalisch) in 400 ccm + 20 g Hefe OM + 20 ccm Toluol.

„Während in 10,0 ccm der Ausgangslösung (460,0 ccm) 0,0663 g Gesamt-P_2O_5 enthalten waren, ergab sich in je zwei gut übereinstimmenden Kontrollanalysen die Menge des abgespaltenen anorganischen Phosphats in 10,0 ccm Lösung:

Tage	P_2O_5	
1	0,0258	38,9 %
2	0,0344	51,9
3	0,0385	58,1
5	0,0428	64,6
8	0,0442	66,7
∞ ber.	0,0663	

Zum Schluss sind rund ²/₃ des Saccharophosphats enzymatisch zerlegt worden, in gutem Einklang mit anderen Versuchsresultaten mit Oberhefe XII."

Die obigen Zahlen und die nebenstehende Figur zeigen, dass die Reaktion auch bei der verhältnismässig hohen Verdünnung des Substrates (5%) nur bis zum Verbrauch von etwa ²/₃ des organischen Phosphates verläuft, was auffallend ist, da dieser Endzustand kaum dem natürlichen Gleichgewicht entspricht.

Auf die alkoholische Gärung der Saccharophosphate kommen wir bei der Besprechung der Gärungsreaktionen zurück.

---

[1]) Neuberg u. Pollak, Biochem. Zs 23, 515; 1910. 26, 514; 1910. — Chem. Ber. 43, 2060; 1910.

[2]) Djenab u. Neuberg, Biochem. Zs 82, 391; 1917.

[3]) Unterschiede hinsichtlich der Vergärbarkeit des Zymophosphats und des Saccharophosphats durch lebende Hefe können mit der verschiedenen *Permeabilität* der beiden Ester zusammenhängen; als zwingender Beweis für die Verschiedenheit der entsprechenden Phosphatasen kann die Vergärbarkeit der Saccharophosphate durch lebende Hefen kaum herangezogen werden.

Glukosidphosphorsäuren, wie sie von Neuberg und Pollak (l. c.) und, nach einem neueren Verfahren, von E. Fischer[1]) in grösserer Zahl dargestellt wurden, sind bis jetzt noch nicht enzymatisch untersucht worden.

3. Stärkephosphatasen.

Die im Malz vorkommenden organischen Phosphate werden durch die im gleichen Material befindlichen Phosphatasen gespalten[2]). Welche Bestandteile des Malzes hierbei die eigentlichen Substrate bilden, ist noch nicht vollständig bekannt; sicher ist nur, dass sich Phytin unter diesen Phosphaten befindet, und dass demgemäss die Phytase (siehe S. 63) an der enzymatischen Abspaltung von PO_4 aus Malz beteiligt ist. Nach den bemerkenswerten Untersuchungen von Samec[3]) enthält aber Stärke verschiedener Herkunft ein Phosphat eines höheren Kohlehydratrestes; möglicherweise ist dieses Phosphat der wesentliche Bestandteil des Amylopektins. Jedenfalls kommt dieses Substrat hier in Betracht und das entsprechende Enzym, das etwa als Amylo-Phosphatase zu bezeichnen wäre, verdient eine eingehendere Untersuchung.

Adler nimmt im Malz mindestens 2 Arten von Phosphatasen an, „von denen die eine unlösliche organische Phosphatkomplexe in Lösung bringt, während die andere anorganische Phosphate bildet“.

Adler gibt ein Temperaturoptimum für die Phosphatasen bei 58° an.

„Die Phosphatasen sind ziemlich widerstandsfähig gegen eine Behandlung mit Alkohol in der Hitze. Zur Vernichtung der Enzyme wendet man am besten eine Abkochung mit etwa 85%igem Alkohol an.“

„Die Enzyme, welche die löslichen Phosphate entstehen lassen, stellen praktisch nach 5 Stunden ihre Wirksamkeit ein; bei den die anorganischen Phosphate liefernden Enzymen tritt dies erst nach 14 Stunden ein.“ In einem Extrakt von 1 Teil Malz mit 20 Teilen Wasser findet der beste Abbau statt.

Die grösste Bedeutung kommt der Azidität zu. „Bei einem $pH = 5{,}4$ lässt sich die gesamte Phosphorsäure des Malzes in Lösung bringen, wovon etwa 93% anorganischer Natur sind. Gegen Hydroxylionen sind die Phosphatasen weit empfindlicher als gegen Wasserstoffionen. Bei stark saurer Reaktion geht aus dem Malz eine organische Phosphorverbindung in Lösun, das Phytin.“

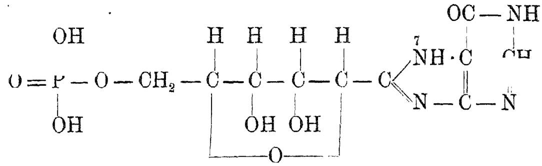
4. Nukleotidasen.

Die von Levene[4]) unter obigem Namen angenommenen, teilweise noch hypothetischen Enzyme sollen aus „Nukleotiden“ Phosphorsäure abspalten, so dass die Verbindung von Kohlehydrat und Purin- oder Pyrimidinbase zurückbleibt. Nehmen wir als Beispiel für ein Nukleotid eines aus der bis jetzt am besten bekannten Gruppe der Ribose-Nukleotide, etwa Guanylsäure, so wäre der Vorgang also schematisch folgendermassen darzustellen:

$$\text{Phosphorsäure-Ribose-Guanin} \xrightarrow[\text{tidase}]{\text{Nukleo-}} \text{Phosphorsäure} + \text{Ribose-Guanin}.$$

[1]) E. Fischer, Berl. Sitz.-Ber. 36, 905; 1914.
[2]) Adler, Biochem. Zs 70, 1; 1915.
[3]) Samec, Kolloidchem. Beih. 6, 32; 1914.
[4]) Levene und Medigreceanu, Jl Biol. Chem. 9, 65 und 389; 1911.

Die Stellung des Phosphatrestes in der Ribose ist bereits bei einem dieser Nukleotide bekannt, nämlich bei der Inosinsäure (Hypoxanthin-d-Ribosid-δ-Phosphorsäure, wo PO_4 am δ-Kohlenstoffatom sitzt[1]):



Unsicher ist noch, ob das Hypoxanthin an der Stelle 8 oder 7 mit der Ribose verbunden ist.

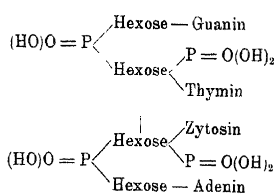
Die Phosphatgruppe wird aus der Inosinsäure verhältnismässig langsam abgespalten, die Inosinsäure ist also in dieser Hinsicht recht stabil, was vermutlich auch mit der Ribosephosphorsäure selbst der Fall ist[2]). Yamagawa hat verschiedene hierher gehörende Substanzen vergleichend mit 0,1 n · H_2SO_4 bei 100° hydrolysiert und folgende Zahlen für die Abspaltungsgeschwindigkeit der Phosphorsäure, ausgedrückt in monomolekularen Reaktionskonstanten, gefunden:

	$k \cdot 10^3$
Nukleinsäure	1300
Guanosinphosphorsäure	1770
Adenosinphosphorsäure	1660
Uridinphosphorsäure	480
Inosinsäure	470
Hexothymidindiphosphorsäure	726

In diesem Zusammenhang sei auf Messungen der Stabilität verschiedener Zuckerphosphorsäuren hingewiesen, welche Levene und Yamagawa[3]) ausgeführt haben.

Vorkommen. Nukleotidasen konnten Levene und Medigreceanu in Presssäften von Leber, Niere, im Blut und Blutserum nachweisen; besonders wurde der Darmsaft und der Auszug der Darmschleimhaut sehr wirksam befunden, Pankreasextrakt scheint nicht alle Nukleotide anzugreifen.

Ob die Nukleotidasen, welche die Phosphorsäure von Pyrimidinhexosiden, bzw. von der darin enthaltenen Hexose, abspalten, z. B. von Thymonukleinsäure



[1]) Levene und Jacobs, Biochem. Zs 28, 127; 1910. — Chem. Ber. 44, 746; 1911.
[2]) Yamagawa, Jl Biol. Chem. 43, 339; 1920.
[3]) Levene und Yamagawa, Jl Biol. Chem. 43, 323; 1920.

identisch sind mit denjenigen, welche Riboside angreifen, bleibt noch festzustellen.

Amberg und Jones[1]) bezeichnen das Enzym, welches Phosphorsäure aus Nukleinresten (Nukleotiden) abspaltet als „Phosphonuklease", während sie für die Enzyme, welche zur Abspaltung von Purinbasen führen, den Namen „Purinnukleasen" vorschlagen. Die Annahme von der unabhängigen Existenz der beiden erwähnten Enzyme gründen Amberg und Jones hauptsächlich darauf, dass die Hundeleber zwar Phosphorsäure aus der Nukleinsäure abspaltet, aber nicht Adenin. „Denn wäre letzteres der Fall, so müsste sich das so gebildete Adenin als Endprodukt auffinden lassen, da diese Drüse durchaus unfähig ist, Adenin irgendwie weiter zu ändern."

Wir kommen auf die Spaltung der Nukleinsäuren, besonders auf die Abspaltung der Basen bei der Behandlung der proteolytischen Enzyme wieder zurück.

B. Glyzerin-Phosphatase.

In der Natur kommt Glyzerinphosphorsäure als Spaltprodukt des Lezithins und anderer Phosphatide vor. Willstätter und Lüdecke[3]) haben zuerst gezeigt, dass die Glyzerinphosphorsäure des Lezithins optisch aktiv, und zwar linksdrehend, ist. Eine mit Willstätters Substanz vermutlich identische Glyzerinphosphorsäure haben Levene und Rolf[4]) aus Zephalin isoliert.

Die stark spaltende Wirkung einer lebenden Hefe auf das Natriumsalz der Glyzerinphosphorsäure ist zuerst von Neuberg und Karczag[5]) beschrieben worden.

4,3 g glyzerinphosphorsaures Na wurden mit 10 g Hefe XII des Berliner Inst. f. Gärungsgewerbe und 200 ccm Wasser angesetzt. Während 48 Stunden wurden bei 29° bei einem Versuch fast 50%, bei einem anderen 42% des Gesamtphosphors des zugesetzten Substrates in Freiheit gesetzt, während in Kontrollversuchen ohne Hefe nur eine spurenweise Spaltung erfolgte. Die Hefe allein lieferte bei den eingehaltenen Versuchsbedingungen nur etwa 4% des gefundenen anorganischen Phosphats.

Dieser Befund ist auch deshalb bemerkenswert, weil Na-Zymophosphat durch lebende Hefe — aus einer noch nicht aufgeklärten Ursache — nicht gespalten wird.

Grosser und Husler zeigten, dass Darmschleimhaut[6]) und Nierenzellen ein Enzym besitzen, das Glyzerinphosphatlösung vollständig spaltet, und dass ein solches Enzym in geringerer Menge auch in den Lungen ent-

[1]) Amberg u. Jones, H. 73, 407; 1911.
[2]) Siehe hierzu auch London u. Schittenhalm, H. 70, 10; 1910.
[3]) Willstätter u. Lüdecke, Chem. Ber. 37, 3753; 1904.
[4]) Levene u. Rolf, Jl Biol. Chem. 40, 1; 1919.
[5]) Neuberg u. Karczag, Biochem. Zs 36, 60; 1911.
[6]) Grosser u. Husler, Biochem. Zs 39, 1; 1913. Bestätigt von Plimmer, vergl. S. 55.

halten ist. Leber[1]) und Milz enthalten nur Spuren; Pankreas[1]), Muskel, Herzmuskel und Blut wurden mit negativem Ergebnis untersucht.

Die Spaltung durch die tierische Glyzerin-Phosphatase beschränkt sich nach den genannten Autoren nicht auf die natürliche, optisch-aktive Form, die durch Verseifung des Lezithins gewonnen wird, sondern soll auch vollständig bei Anwendung des synthetischen, inaktiven Substrates verlaufen. Ob dies bei allen Aziditäten der Fall ist, bleibt zu untersuchen.

Plimmer (vergl. S. 55) erhielt Glyzerinphosphat-Hydrolyse auch mit Trockenhefe, Rizinussamen und mit Kleie.

Aus der Tatsache, dass aus Darm, Niere und Lunge ein Glyzerinphosphat spaltendes Enzym erhalten wird, nicht aber aus Pankreas und Leber, schliesst er, dass die Phosphatase nicht mit Lipase bzw. den Esterasen der ersteren Organe identisch ist. Er hebt in dieser Hinsicht ferner hervor, dass das Enzym der Phosphatspaltung, das sich in Rizinussamen findet, durch Wasser extrahiert werden kann, während die Rizinuslipase in Wasser unlöslich ist.

Falk und Sugiura[2]) fanden allerdings in Rizinussamen eine wasserlösliche Esterase, welche mit der Glyzerinphosphatase möglicherweise identisch ist. Falk[3]) hat dieses Enzym näher untersucht. Er fällt die filtrierten und dialysierten wässerigen Auszüge mit Azeton. Der Aschegehalt der Substanz betrug 5%.

Das Präparat enthielt, aschefrei und trocken, 15,4—16,3% N und 0,36 bis 0,9% P. Die Substanz gab keine Reaktion auf Kohlehydrate, enthielt viel Tryptophan, viel aromatische Gruppen und Spur von Tyrosin.

Falk hält das Enzym für ein Protein.

Němec[4]) untersuchte die Samen folgender höherer Pflanzen hinsichtlich ihrer Fähigkeit Glyzerinphosphorsäure zu spalten. Der folgende Auszug aus seiner Tabelle enthält die Menge P_2O_5 in %, welche mit 5 g Samen während 48 Stunden bei 25° aus Glyzerinphosphorsäure abgespalten werden.

Hordeum distichum	1,07	Lens esculenta	28,62
Secale cereale	1,15	Polygonum fagopyrum	28,66
Avena sativa	1,16	Helianthus annuus	29,19
Lupinus angustifolius	4,62	Pisum sativum	30,45
Zea Mays	14,73	Ricinus communis	31,69
Vicia Faba	16,69	Linum usitatissimum	32,32
Picea excelsa	17,50	Brassica napus	33,57
Prunus communis	22,23	Raphanus sativus	34,19
Cannabis sativa	23,74	Sinapis alba	41,34
Papaver somniferum	26,56	Glycine hispida	49,97

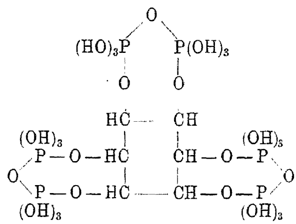
Dass die Spaltungsgrenze 50% nie überschritten wird, dürfte darauf hindeuten, dass aus der synthetischen, also razemischen Glyzerinphosphorsäure

[1]) Grosser u. Husler, Biochem. Zs 39, 1; 1913. Bestätigt von Plimmer, vergl. S. 55.
[2]) Falk und Sugiura, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 217; 1915.
[3]) Falk, Proc. Nat. Acad. of Science, Boston, 1, 136; 1915.
[4]) Němec, Biochem. Zs 93, 94; 1918.

nur die natürlich vorkommende Form angegriffen wird, was besonders in Rücksicht auf Grossers und Huslers Ergebnisse noch näherer Untersuchung bedarf.

C. Phytase.

Substrat. Das Phytin ist nunmehr als Inositphosphorsäure erkannt[1]), und zwar kommen nach den Analysen 6 PO_4-gruppen auf 1 Molekül Inosit, $C_6H_{12}O_6$, wonach also dem Phytin etwa die folgende Formel zukommt (Neuberg):



Bemerkenswert ist, dass die Phosphorsäure aus dem Phytin verhältnismässig leicht abgespalten wird[2]).

Über die Art der Bindung der Phosphorsäure und die Stellen der freien Hydroxylgruppen herrscht noch nicht völlige Klarheit. Die weite Verbreitung des Phytins im Pflanzenreich ist durch die Arbeiten von Suzuki und Yoshimura sowie von Schulze und Winterstein erkannt worden.

Dass das Phytin in den Pflanzen von einer spezifischen Phosphatase begleitet wird, haben zuerst Suzuki, Yoshimura und Takaishi[3]) angegeben, welche für dieses Enzym den Namen Phytase vorgeschlagen haben[4]). Sie konnten bei der enzymatischen Spaltung neben Phosphorsäure auch Inosit nachweisen.

In Aspergillus niger und anderen Schimmelpilzen wurde Phytase von Dox[5]) nachgewiesen.

Im Gegensatz zu Plimmer konnten Mac Collum und Hart[6]) Phytin durch Auszüge aus tierischen Organen (Leber und Blut, nicht Niere und Muskel) spalten.

Vorkommen. Die oben genannten japanischen Forscher haben die Phytase aus Reiskleie gewonnen. Sie ist, wie man jetzt weiss, in zahlreichen Pflanzensamen (siehe auch Plimmer, S. 55) enthalten und kann z. B. aus Grünmalz leicht dargestellt werden.

---

[1]) Suzuki, Yoshimura, Bull. Coll. Agric. Tokyo, 7, 495; 1907. Neuberg, Biochem. Zs 5, 443; 1907 und 9, 557; 1908. — Posternak, C. r. 169, 79; 1919.

[2]) Siehe hierzu Jegorow, Biochem. Zs 42, 432; 1912 und 61, 41; 1914.

[3]) Suzuki, Yoshimura u. Takaishi, Bull. Coll. Agric. Tokyo, 7, 504; 1907.

[4]) Zaleski, Bot. Ber. 24, 285; 1906 hatte bereits darauf hingewiesen, dass aus löslichen Phosphorverbindungen in keimenden Samen Phosphorsäure freigemacht wird.

[5]) Dox, Jl Biol. Chem. 10, 183; 1911.

[6]) Mac Collum u. Hart, Jl Biol. Chem. 4. 497; 1908.

Darstellung. Suzuki und seine Mitarbeiter haben ihre Reiskleienphytase mittels Alkohol gefällt. Adler[1]) beschreibt seine Darstellungsmethode aus Grünmalz eingehender:

Das 14 Tage gekeimte Grünmalz wird gequetscht, 700 g davon werden 7 Stunden lang mit 2,5 l 25%igen Alkohols extrahiert. Der von den festen Rückständen abfiltrierte Extrakt wird nun mit dem 3½fachen Volumen 96%igen Alkohols versetzt; der hierdurch entstehende flockige Niederschlag setzt sich in 3 Stunden ab; er wird durch Filtration von der Flüssigkeit getrennt und dann mit Alkohol und Äther gewaschen.

Die Darstellungsweise ist also ganz ähnlich der von Lintner für Amylase angegebenen.

Optimale Azidität: Adler (l. c.) fand pH = 5,4—5,5.

Temperatur: Adler gibt als günstigste Temperatur für die Phytasewirkung 56° an.

Spaltungsgrenze: Unter den optimalen Bedingungen konnte Adler bis zu 72% des angewandten Phytins zerlegen.

Analytische Methoden: Die Bestimmung des Phytins haben besonders Plimmer und Heubner eingehend bearbeitet (siehe unten).

D. Methoden zur Bestimmung der organischen Phosphate.

In erster Linie kommen die Molybdatmethode und die Fällung mit Magnesiamischung in Betracht. Auch die Urantitration nach Neubauer kann, wenn keine grosse Genauigkeit erforderlich ist, verwendet werden.

Eine auch zur Bestimmung von PO_4 in organischen Phosphaten vielfach brauchbare Methode hat Neumann angegeben[2]). Für die Untersuchung von Phytin ist eine Modifikation erforderlich (Plimmer und Bayliss[3]); Heubner[4])).

Zur Verfolgung der enzymatischen Spaltung muss anorganisches Phosphat neben den verschiedenen organischen Phosphaten bestimmt werden. Letztere verhalten sich hinsichtlich der beiden hauptsächlichen Fällungsmittel (Magnesiamischung und Ammoniummolybdat) verschieden.

Während es nach Vorbrodt[5]), Plimmer und Page[6]) u. a. notwendig ist, bei Arbeiten mit Phytinlösungen die Molybdänmethode (bei 37°) zu verwenden (nach Heubner l. c. kann dies ohne Störung nur bei Anwesenheit geringer Phytinmengen geschehen), kann man anorganisches Phosphat von Kasein[3]) von Glycerophosphat und von Zymophosphat durch Magnesiamischung trennen, und zwar unter Vermeidung höherer Temperaturen.

---

[1]) Adler, Biochem. Zs 75, 319; 1916. — Siehe auch Seite 59.
[2]) Neumann, H. 37, 115; 1903. — 43, 32; 1905.
[3]) Plimmer u. Bayliss, Jl Physiol. 33, 439; 1906.
[4]) Heubner, Biochem. Zs 64, 401; 1914.
[5]) Vorbrodt, Bull. Acad. Cracovie, A, 418; 1910.
[6]) Plimmer u. Page, Biochem. Jl 7, 163; 1913.

Jedenfalls ist stets die Zersetzlichkeit desjenigen organischen Phosphats, mit welchem man arbeitet, genau in Betracht zu ziehen.

Mikro-Methoden zur Bestimmung von PO_4 sind 1919 von Kleinmann[1]) angegeben und eingehend besprochen worden, und zwar eine kolorimetrische, eine sedimetrische und eine nephelometrische.

Das Prinzip der Kleinmannschen Bestimmung der Phosphorsäure als Alkaloidphosphomolybdat ist neuerdings von Embden[2]) mit Erfolg zu einer gravimetrischen Mikromethode ausgearbeitet worden.

Die Mikromethode von Svanberg, Zimmerlund und Sjöberg[3]) beruht darauf, dass das Ammoniak des Ammoniumphosphomolybdats nach einer der gebräuchlichen Mikro-Kjeldahl-Methoden bestimmt wird. Phosphormengen von 0,05—1,00 mg P lassen sich nach dieser Methode auf etwa 3 % genau ermitteln.

Siehe auch: Pregl, Die quantitative organische Mikroanalyse. Berlin 1917. S. 133.

[1]) Kleinmann, Biochem. Zs 99, 19 u. ff.; 1919.
[2]) Embden, H. 113, 138; 1921.
[3]) Svanberg, Zimmerlund u. Sjöberg, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 8; 1921.

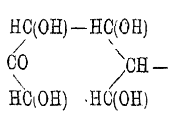
3. Kapitel.

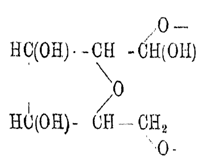
Zellulase und Hemizellulasen. Inulinase und Pektinasen.

A. Zellulase.

Obwohl die Zersetzung des Holzes durch Pilze und Mikroorganismen vielfach studiert worden ist, sind enzymologisch brauchbare Ergebnisse erst in letzter Zeit gewonnen worden. Dies lag zum Teil daran, dass meist Substrate gewählt worden waren, welche zwar für das Wachstum der untersuchten Organismen einen günstigen Nährboden lieferten, aber chemisch wenig definiert waren; es stand also nicht fest, welcher ihrer Bestandteile tatsächlich die biochemische Zersetzung erfahren hatte, wenn eine solche nachgewiesen werden konnte. Die Verwendung von reiner Zellulose (Filtrierpapier) als Substrat bei den Versuchen von van Iterson[1]) mit holzzerstörenden Schimmelpilzen hat demgemäss schon einen erheblichen Fortschritt gebracht. Der Nachweis einer eigentlichen „Zellulase", also eines die Zellulose hydrolytisch spaltenden Enzyms wurde ferner dadurch erschwert, dass die Mikroorganismen, welche die Zellulose spalten, sofort über diese erste Stufe des Angriffes hinausgehen und die Spaltprodukte unter Hydrolyse, Veratmung oder Vergärung weiter verbrauchen.

Substrat. Die Zellulose, $(C_6H_{10}O_5)_n$, ist nur ihrer Elementarzusammensetzung nach bekannt, während die Ermittelung ihrer Konstitution und Konfiguration noch nicht gelungen ist. Die bezüglich ihres Baues wichtigste Tatsache ist wohl die, dass die Hydrolyse mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure Zellobiose[2]) liefert, wodurch ein wesentlicher Unterschied gegenüber der Stärke festgestellt ist. Von den meisten Zellulose-Chemikern werden ringförmige Bindungen im Molekül angenommen, sei es, wie von Gross und Bevan, Zyklo-Ketohexangruppen (I) oder, wie von Green, kombinierte Oxyfuranringe (II).

(I) 

 (II)

[1]) C. van Iterson jr., Versl. K. Akad. v. Wetensch. Amsterdam 11, 807; 1903. — Zbt. f. Bakt. II, 11, 689; 1904.

[2]) Siehe hierzu im 6. Kapitel den Abschn. Zellobiase, ferner Karrer u. Widmer, Helv. 4, 174 und 295; 1921.

Was die nicht enzymatische Spaltung betrifft, so sind verdünnte Mineralsäuren bei gewöhnlichem Druck nur wenig wirksam, bei höherem Druck und höherer Temperatur wird der abgespaltene Zucker gleichzeitig zerstört, weshalb auch die Verzuckerung mit verdünnten Säuren noch nicht zu technisch günstigen Resultaten geführt hat.

Durch konz. Schwefelsäure, und, nach Willstätters technisch wichtiger Entdeckung, durch 41%ige Salzsäure wird Zellulose gelöst. Eine Lösung der Zellulose wird bekanntlich auch durch das 1857 von Schweizer angegebene Reagens — Kupferhydroxyd in konz. Ammoniak — erreicht, wobei sich in Gegenwart von Alkali Kupferalkalizellulose bildet. Die Veränderungen, welche die Zellulose hierbei erleidet, sind noch nicht näher bekannt. Mit kalter Kalilauge entsteht — unter starker Quellung — Kaliumzellulosat.

Vorkommen. Durch die neueren, sehr wertvollen Untersuchungen von H. Pringsheim[1]) haben wir über die Existenz einer wirklichen Zellulase in Bakterien positive Kenntnisse gewonnen.

Auch manche Schimmelpilze scheinen echte Zellulase zu enthalten.

Bezüglich der holzzerstörenden höheren Pilze ist ein Nachweis von gleicher Schärfe bis jetzt nicht erbracht worden.

1. Bakterien-Zellulase.

Wie erwähnt, hat Pringsheim[1]) in Bakterien, und zwar in denitrifizierenden, zelluloseangreifenden Bakterien, welche nach den Angaben van Itersons kultiviert waren, ein Enzym gefunden, welches echte Zellulose unter Bildung von Zellobiose hydrolytisch spaltet.

Der Nachweis, dass bei den untersuchten Bakterien eine hydrolytische Spaltung der Zellulose eintritt, gelang Pringsheim dadurch, dass er vermittels eines geeigneten Antiseptikums (Jodoform) zu den Bakterienkulturen ohne Beeinflussung des hydrolytischen Abbaues der Zellulose das Gärferment unterdrückte; in Gegenwart von Jodoform entgingen die hydrolytischen Produkte, Zellobiose und Glukose, den Gärungsspaltungen. Wie gleich erwähnt sei, konnte auch die Wirkung der Zellobiase, durch welche die Glukose entsteht, eliminiert werden; bei 67° nämlich, also nahe am Tötungspunkt der Zellulase, wurde bei gleichzeitiger Unterdrückung des Gärfermentes durch das Antiseptikum auch die Zellobiase ausser Tätigkeit gesetzt. Bei dieser Temperatur gelang es, den Zelluloseabbau so zu leiten, dass als einziges Hydrolyseprodukt Zellobiose erhalten wurde. Auch konnte festgestellt werden, dass durch die untersuchten Mikroorganismen eine restlose Lösung des Polysaccharids erreicht werden kann.

Die Bakterienzellulase ist nach Pringsheim ein Endoenzym, das nur auf Grund des Reizes, den die Zellulose auf die Zelle ausübt, abgeschieden wird; sie scheint in Wasser unlöslich zu sein.

[1]) H. Pringsheim, H. 78, 266; 1912.

Bei 20° „ging hingegen die Hydrolyse der Zellulose teilweise über die Zellobiose hinaus, und als Hauptprodukt wurde Glukose gefasst".

Extrahierbarkeit der Cellulase. Da die Zellulose nicht in die Bakterienzellen eindringen kann, muss die Zellulase von den Zellen abgeschieden werden, um auf das Substrat wirken zu können. „Damit ist aber noch nicht entschieden, ob das Ferment in wasserlöslicher Form in die Nährlösung gelangt und hier auf die Zellulose wirkt, oder ob es von den Zersetzern der Zellulose nur auf Grund eines Reizes ausgeschieden wird, welcher von dem Polysaccharid auf seine Verzehrer ausgeübt wird." Mit Recht entscheidet sich Pringsheim für die Auffassung, dass die Zellulase (der Bakterien) ein Enzym ist, das nur auf Grund des Reizes, den die Zellulose auf die Zelle ausübt, abgeschieden wird.

Antiseptika. Die Aufgabe, durch geeignete Wahl von Paralysatoren die Zellulase allein zur Wirkung kommen zu lassen und also die Gärungsenzyme und womöglich auch die Zellobiase zu unterdrücken, konnte bei der hohen Temperatur der energischen thermophilen Zellulosegärung durch Toluol, ein zuerst von Vandevelde[1]) in Vorschlag gebrachtes Mittel, nicht gelöst werden; dagegen erwies sich Jodoform als brauchbar, und zwar wurde es so verwendet, dass man für 2 l Gärflüssigkeit etwa 1 g in 50 ccm Azeton löste und diese Lösung in die gärende Zellulosekultur unter Schütteln eingoss.

Zellulosegärung.

Die Spaltung der Zellulose durch Mikroorganismen beginnt zweifellos mit Hydrolysen zu Biosen und Hexosen, welch letztere der eigentlichen Gärung unterliegen. Die hier in Betracht kommenden Gärungserreger teilt man nach einem von Barthel aufgestellten Schema zunächst in anaerobe und aerobe ein[2]). Man kann drei anaerobe Gärungen unterscheiden, nämlich: Wasserstoffgärung, Methangärung und Denitrifikationsgärung, welche sämtliche von Bakterien, und zwar von drei verschiedenen Gruppen bewirkt werden.

Nicht weniger wichtig als die anaerobe ist die aerobe Zellulosegärung, welche

a) durch Bakterien, und zwar in neutraler und alkalischer Lösung,

b) durch Schimmelpilze, und zwar in saurer Lösung

durchgeführt wird. Leider ist in chemischer Hinsicht über die aerobe Gärung noch wenig bekannt.

Anaerobe Gärung durch Bakterien. Nachdem van Tieghem und Hoppe-Seyler (1886) bemerkenswerte Versuche über die Zellulosegärung

[1]) Vandevelde, Biochem. Zs 3, 318; 1907.

[2]) Methodisches siehe bei C. A. G. Charpentier, Diss. Helsingfors 1921.

durch Bakterien angestellt hatten, schuf Omelianski in einer Reihe eingehender Untersuchungen die festen bakteriologischen Grundlagen für die Zellulosegärung durch anaerobe Bakterien. Er stellte fest, dass man zwischen Wasserstoffgärung und Methangärung der Zellulose unterscheiden muss, und dass jeder der beiden Vorgänge durch einen besonderen Mikroben ausgelöst wird. Für die beiden Gärungen gibt er folgende Bilanzen an:

Wasserstoffgärung:		Gärprodukte:	
Zum Versuch verwendet	3,4743 g	Fettsäuren	2,2402 g
Unzersetzt geblieben	0,1272 g	Kohlensäure	0,9722 g
Durch Gärung verschwund.	3,3471 g	Wasserstoff	0,0138 g
		Zusammen	3,2262 g

Methangärung:		Gärprodukte:	
Zum Versuch verwendet	2,0815 g	Fettsäuren	1,0223 g
Unzersetzt geblieben	0,0750 g	Kohlensäure	0,8678 g
Durch Gärung verschwund.	2,0065 g	Methan	0,1372 g
		Zusammen	2,0273 g

Ich verweise im übrigen auf die zusammenfassende Darstellung Omelianskis in Lafars Handbuch III, 245, 1904 und eine spätere Arbeit dieses Forschers in Zbt. Bakt. II 36, 472; 1913[1]).

Pringsheim hat die Bildung von Glukose sowohl bei der Methangärung als bei der Wasserstoffgärung nachgewiesen[2]).

13 g schon einmal zu einer Methangärung verwandter Zellulose wurden zusammen mit 5 g $CaCO_3$ in 4 Liter Leitungswasser, das 4 g $(NH_4)_2SO_4$, ferner 0,6 g K_2HPO_4 und 0,1 g $MgSO_4 + 7 H_2O$ enthielt, aufgeschwemmt und mit einer in starker Gärung befindlichen Kultur beimpft. Nach 4 Tagen war die Gärung stark im Gange. Es wurde, immer bei 37°, Toluol zugegeben. Nach 7 Tagen war noch keine Reduktion der Nährflüssigkeit bemerkbar, am 10. Tage trat sie ein. Aus dieser Lösung wurde nun nach Zusatz von Phenylhydrazin das Glukosazon isoliert. Neben diesem war noch ein in Wasser lösliches Osazon erhalten worden.

In analoger Weise verlief der Nachweis der Glukose nach der Wasserstoffgärung.

Nach der Einwirkung thermophiler Bakterien (kultiviert nach den Angaben von McFayen und Blaxall[3])) konnte Pringsheim nicht nur Glukose sondern auch Zellobiose nachweisen[4]).

Das gleiche Ergebnis wurde mit Sicherheit erzielt bei Versuchen mit denitrifizierenden Bakterien.

Pringsheim leitete in Anlehnung an van Itersons Vorschlag eine denitrifizierende Zellulosezersetzung ein, indem er 2% Filtrierpapier in Leitungswasser unter Zusatz von

[1]) Siehe ferner McBeth und Scales, U. S. Dept. of Agr. Bur. of Plant Industry. Bull. 226. Ref. Zbt. Bakt. II 39, 167; 1913.

[2]) Über die Produkte der Zellulosegärung durch thermophile Bakterien siehe Pringsheim, Zbt. Bakt. II, 38, 513; 1913, ferner Hutchinson und Clayton, Jl Agric. Soc. Cambridge 1919, 143.

[3]) McFayen und Blaxall, Trans. Jenner Inst. Prev. Med. (2) 1899, 182 (zitiert nach Pringsheim).

[4]) Über die weite Verbreitung thermophiler (Optimum 60°—65°) zelluloseangreifender Bakterien in Mistbeeterde u. dergl. siehe Kroulik, Zbt. Bakt. II, 36, 339; 1912.

0,05 % KNO_3 und 0,01 % K_2HPO_4 aufschwemmte, eine Stöpselflasche mit der Nährlösung vollfüllte und mit Grabenmoder beimpfte. „Inkubiert man bei 37°, so setzt im Laufe einer Woche energische Stickstoffbildung ein, durch die das Papier in die Höhe getrieben wird.“ Zur Verstärkung der Gärung erneuert man nun mehrmals die Nährflüssigkeit; das Papier wird durch die mehrfache Behandlung mit den denitrifizierenden Bakterien gewissermassen angeätzt; nun geht bei Zusatz des Jodoforms die Bildung der Hydrolyseprodukte weiter, während die Gärung unterdrückt wird. Der Nachweis der Glukose und der Zellobiose ist im Original, S. 283 u. ff., nachzusehen.

Bekanntlich ist die Verwertbarkeit des Holz- und Strohstoffs als Pferde-, Rinder- und Schweinefutter in den letzten 5 Jahren, besonders durch N. Zuntz und seine Mitarbeiter vielfach untersucht worden. Dabei hat sich der frühere Befund[1]) bestätigt, dass zellulosespaltende Enzyme ebensowenig im Verdauungstraktus dieser Tiere wie in dem des Menschen sezerniert werden, sondern dass Zellulose von den untersuchten Tieren dadurch „verdaut“ wird, dass ihre Bakterienflora Zellulosegärung hervorzurufen imstande ist. Die einleitenden Hydrolysen, welche zunächst zu Dextrinen, Zellobiose und Glukose führen müssen, sind allerdings hierbei noch nicht untersucht worden; Endprodukte dieser Zellulosegärungen sind CO_2 und Methan, ferner noch fette Säuren, besonders Buttersäure[2]) (neben etwas Ameisensäure, Essigsäure und Milchsäure), also Produkte, welche aus der Glukose entstanden sein dürften. Inwieweit die durch Hydrolyse gebildeten Zuckerarten und die durch Gärung entstehenden nicht gasförmigen Produkte vom Darm resorbiert werden, bleibt noch zu untersuchen. Was die bakterielle Bildung von brennbaren Gasen aus zellulosehaltigem Material betrifft, so kann dieser Teil der Gärungsreaktion vom tierischen Organismus höchstens durch die Aufnahme der Gärungswärme ausgenützt werden; die damit zusammenhängenden energetischen Fragen sind bis jetzt noch verhältnismässig wenig besprochen worden.

Im Darmkanal des Menschen wird, wie durch Untersuchungen von J. E. Johansson[3]) festgestellt ist, die Zellulose nicht angegriffen oder verwertet. Ob hierzu die Bakterienflora des menschlichen Darmkanals überhaupt ungeeignet ist, oder die Einwirkungszeit zu kurz ist, um merkbare Veränderungen hervorzubringen, ist noch nicht entschieden.

2. Zellulase der Pilze.

Niedere Pilze.

Von älteren Arbeiten seien hier folgende angeführt:

Newcombe[4]) beschreibt in einer Arbeit über Cellulose-Enzyme ein Enzym aus Aspergillus Oryzae, das Zellulose angreift. Wehmer[5]) beobachtete

[1]) Siehe besonders Scheunert, H. 48, 9; 1908. — Ältere Versuche über Zellulose-Verdauung im menschlichen und tierischen Organismus, besonders beim Hund, findet man in den Arbeiten von Lohrisch, H. 47; 1906 und 69, 143; 1910.

[2]) Siehe hierzu Krogh und Schmit-Jensen, Biochem. Jl 14. 686; 1920.

[3]) J. E. Johansson, Sv. Läkaresällsk. Förhandl. 1918, 218.

[4]) Newcombe, Ann. of Bot. 13, 49; 1899.

[5]) Wehmer, Zbt. Bakt. II, 2, 140; 1896.

eine Einwirkung auf Zellulose durch Aspergillus Wentii und Went[1]) durch Monilia sitophila.

Hoppfe[2]) gibt an, aus dem Pansen des Rindes einen „Aspergillus cellulosae" gezüchtet zu haben, welcher durch sein Wachstumsoptimum bei 35°—37° charakterisiert ist und beim Wachstum echte Zellulose (Filtrierpapier) aufzehren soll; er ist von Ellenberger[3]) eingehender untersucht worden. Nach seinen Angaben wurde die Zellulase dieses Pilzes in folgender Weise zur Wirkung gebracht:

Man brachte in sterile Kölbchen die betr. Nährlösung mit Filtrierpapier, das mit Chloroformdampf sterilisiert war und setzte Pilzsporen zu. Nach 3 Wochen war unter der inzwischen gebildeten sporenhaltigen Myzel-Faserdecke eine breiige, faserige Masse entstanden. Diese Sporen, Myzelien, Hyphen und Zellulosefasern enthaltende Flüssigkeit wurde durch ein Berkefeld-Filter gesaugt. Die filtrierte Flüssigkeit erwies sich keimfrei. Dies keimfreie Filtrat wurde in je 3 sterilen Reagenzgläsern verteilt mit Zusatz von Filtrierpapierstreifen. Zum Schutz gegen Eindringen von Luftkeimen wurde 1 ccm Toluol auf die Oberfläche der Flüssigkeit gebracht. Nach 14 Tagen (Temp. 22°) sah man Auffaserung des Papiers, nach weiteren 14 Tagen war das Papier so zerfallen, dass beim Schütteln ein Brei entstand. Irgend ein Pilzwachstum war nicht zu beobachten, auch nach Beimpfen von 3 Platten Mannitagar trat kein Wachstum ein.

Ob die Entstehung des Faserbreies von einer Enzymwirkung herrührt, lässt sich aus der Mitteilung nicht beurteilen.

In Versuchen, bei welchen der lebende Pilz zugegen war, soll in 10 Tagen etwa 5% der anwesenden Zellulose in Lösung gegangen sein; bei diesen Versuchen wurde auf Spaltprodukte mit Fehlingscher Lösung usw. geprüft; Zucker wurde aber leider nicht zu isolieren versucht.

In Penicillium glaucum fand Heller[4]) wenig, in Mucor mucedo keine Zellulase.

Höhere Pilze.

Bemerkenswerte Resultate hat C. van Iterson jr.[5]) mit nicht näher bestimmten Holz zerstörenden Pilzen erhalten, die zur Gruppe der Hyphomyzeten gehören. Wurden die auf Papier gewachsenen Pilze durch kräftiges Schütteln mit Toluol abgetötet, so erlangte die Nährlösung die Fähigkeit, Fehlingsche Lösung zu reduzieren, und Glukose konnte als Osazon nachgewiesen werden. Ein die Zellulose spaltender Presssaft wurde allerdings aus diesen Pilzen nicht gewonnen.

Eine spezifische Fähigkeit zur Lösung der Zellulose fand F. Heller (l. c.) bei 11 Fusarium-Arten, ferner bei Rhizoctonia solani und Trichothecium roseum; nach dem gleichen Verfasser wird durch Pilze vom Typus des Fusarium Lolii echte Zellulose angegriffen, während Hemizellulosen intakt bleiben.

---

1) Went, Jahrb. wiss. Bot. 36, 611; 1901.

2) Hoppfe, Zbt. Bakt. 83, 531; 1919.

3) Ellenberger, H. 96, 236; 1915.

4) Heller, Dissert. Rostock, 1917.

5) van Iterson jr., Verslagen der Kon. Akademie van Wetensch. Amsterdam 9, 807; 1903. — Zbt. Bakt. II, 11, 689; 1904.

Bereits früher hatte Kohnstamm angegeben, das Presssaft des Hausschwammes, Merulius lacrimans, auf Blättern von Elodea ähnliche Korrosionen hervorruft, wie der lebende Pilz. Dass aber diese Einwirkung auf die beginnende Spaltung einer echten Zellulose zurückzuführen ist, halte ich, in Übereinstimmung mit Pringsheim, für recht zweifelhaft.

Durch Behandeln der Zellulose mit 70-prozentiger Schwefelsäure nimmt die Zellulose Wasser auf und geht in Hydrozellulose oder Amyloid über, dem die Formel $(C_{12}H_{22}O_{11})_x$ zugeschrieben wird; daneben entstehen unter Spaltung Zellulosedextrine, welche gegen Säure- und Alkalispaltung weniger widerstandsfähig sind als Zellulose. Auf ein Gemenge solcher Zellulosedextrine hat Verf.[1]) den Presssaft von Merulius lacrimans wirken lassen und konnte nach längerer Zeit Reduktion in der Lösung, von Spaltprodukten herrührend, nachweisen.

B. Hemizellulasen (Zytasen).

Die Bezeichnung „Hemicellulosen" ist von E. Schulze eingeführt worden, dem man eingehende Studien über diese Stoffgruppe verdankt, und wurde von Winterstein, Tollens u. a. angenommen; sie wird demgemäss hier beibehalten, wenn auch gleich betont werden muss, dass „Hemicellulosen" chemisch keineswegs scharf abgegrenzt sind, sondern als eine ziemlich mannigfaltige Gruppe celluloseartiger Reservestoffe angesehen werden können, welche leichter als eigentliche Cellulose gespalten werden und dabei nicht nur Glukose liefern, sondern auch Mannose, Galaktose und Pentosen[2]). Demgemäss gehören hierher nicht nur die Mannane, Galaktane, Glukomannane usw., sondern auch Pentosane und Pentohexosane.

Bei dieser Verschiedenheit des Substrates ist es natürlich schwer, eine Vorstellung über die Einheitlichkeit der entsprechenden Enzyme zu erhalten.

1. Tierische Hemizellulasen.

Der Abbau von Hemizellulosen im Verdauungstraktus höherer Tiere hat bisher ebensowenig wie derjenige der echten Zellulosen auf Enzymwirkungen ihrer Verdauungssekrete zurückgeführt werden können, vielmehr scheint es sich auch hier durchweg um bakterielle Spaltungen zu handeln (Gatin, Saiki[3]), Scheunert, l. c.). Siehe auch unter Lichenase S. 73.

Dass die Hemizellulosenspaltung im Darm von Fischen von Darmenzymen herrührt (Knauthe), ist von E. Müller[4]) bestritten worden.

[1]) Euler, Zs angew. Chem. 25, 290; 1912.

[2]) Über eine Hemizellulose aus Apfelholz siehe Tottingham, Roberts und Lepkovsky, Jl. Biol. Chem. 45, 407; 1921.

[3]) Saiki, Jl Biol. Chem. 2, 251; 1906.

[4]) E. Müller, Pflüg. Arch. 83, 619; 1901.

Dagegen sind Hemizellulasen mit Sicherheit bei Evertebraten nachgewiesen, so z. B. bei Gastropoden[1]), Krustazeen und Insekten.

Besonders fanden Biedermann und Moritz, sowie Bierry und Giaja eine weitgehende und schnelle Spaltung von Hemizellulosen (Mannanen) im Verdauungstraktus von Helix pomatia. Die ersteren Forscher wiesen ein ähnliches Enzym im Lebersekret des Flusskrebses nach.

Ob die folgenden Enzyme wirklich spezifische Wirkungen ausüben und auf die betr. Substrate beschränkt sind, oder ob sie auch andere Hemizellulosen bezw. Polysaccharide angreifen, steht noch keineswegs fest.

Lichenase.

Das Substrat dieses Enyms, das Lichenin, findet sich besonders im isländischen Moos, Cetraria islandica. Es ist ein im kalten Wasser quellendes, in heissem Wasser lösliches hochmolekulares Kohlehydrat, welches von verdünnter Säure leicht hydrolysiert wird[2]) und, nach der Untersuchung von Ulander und Tollens[3]) neben d-Glukose auch etwas Mannose und Galaktose sowie Pentosen liefert.

Nach v. Tschermak[4]) soll das Lichenin im Kaninchendarm gespalten werden. Von den Renntieren wird das Islandsmoos gut verdaut und ausgenützt. In beiden Fällen kann es sich indessen um Bakterienwirkungen handeln.

Jewell und Lewis[5]) haben bei keinem Wirbeltier Verdauungssäfte finden können, welche Lichenin spalten; dagegen fanden sie bei 20 untersuchten Evertebraten im Verdauungskanal ein wirksames Enzym, das sie als spezifische Lichenase ansehen. Die Spaltung des Lichenins durch gewisse Evertebraten konnte im hiesigen Institut bestätigt werden.

Xylanase.

Seillière[6]) nimmt das Vorkommen eines auf Xylane spezifisch wirkenden Enzyms in Schnecken und in Larven holzzerstörender Käfer (Coleopteren) an.

2. Hemizellulasen der Phanerogamen.

Brown und Morris[7]) fanden zuerst eine Hemizellulase in keimenden Gerstenkörnern. Legt man in einen Auszug von gekeimter Gerste z. B. Kartoffel-

---

[1]) Biedermann und Moritz, Pflüg. Arch. 73, 291; 1898. Seillière, Soc. Biol. 68, 107, 989; 1910. — Bierry und Giaja, C. r. 148, 507; 1910 und Biochem. Zs 40, 370; 1912. Siehe daselbst auch ältere Literatur.

[2]) Die Hydrolyse des Lichenins zum Zweck der Vergärung und Herstellung von „Flechtenbranntwein“ ist 1868 von Stenberg beschrieben worden (Monographie, Stockholm); das Verfahren wurde in Schweden während einiger Zeit in technischem Massstab ausgeführt und in Deutschland 1917 wieder geprüft. — Siehe auch norweg. Pat. 14664. B. Hansteen 1905.

[3]) Ulander und Tollens, Chem. Ber. 39, 401; 1906.

[4]) v. Tschermak, Biochem. Zs 45, 452; 1912.

[5]) Jewell und Lewis, Jl Biol. Chem. 33, 161; 1918.

[6]) Seillière, Soc. Biol. 58, 409, 940; 1905 und 63, 616; 1907.

[7]) Brown und Morris, Jl of Chem. Soc. 57, 497; 1890.

schnitte, so verlieren diese nach wenigen Stunden ihren Zusammenhang und fallen in Stücke, wobei die Zellwände anschwellen und in zahlreiche dünne Lamellen zerlegt werden. Indessen wird in dieser Weise durchaus nicht das Parenchym aller Pflanzen angegriffen, z. B. die Zellwände der roten Rübe nur schwach, die des Apfels überhaupt nicht, entsprechend dem verschiedenen chemischen Material der betreffenden Pflanzenteile[1]). Die Gräser sollen überhaupt reich an Hemizellulase sein[2]).

Auf das Vorkommen in den Palmensamen deuteten schon Beobachtungen von Sachs 1862. Versuche, dieses Enzym mit Glyzerin zu extrahieren, wurden von Green 1887 angestellt (Phil. Trans. 178); Brown und Morris (l. c.) konnten mit Wasser keine Extraktion erzielen. Später wurde das Enzym von Newcombe[3]) näher untersucht. Die Samen von Livistonia humilis, welche eine ähnliche Struktur besitzen wie die Dattelkerne, sind in dieser Hinsicht von Green[4]) studiert worden, dem man auch eine lesenswerte Darstellung über Zytasen in Phanerogamen verdankt[5]).

Nach Brown und Morris wird die Hemizellulase (Zytase) in den Zellen der Aleuronschicht sezerniert, nur wenig in denen des Skutellumepithels.

Darstellung: Ein wässeriger Malzauszug wird mit Alkohol gefällt, zur Entwässerung mit abs. Alkohol behandelt und im Vakuum getrocknet. Das nun haltbare und wirksame Pulver enthält, wie zu erwarten, neben der Zytase noch Amylase.

Aziditätsbedingungen: Nach den englischen Forschern soll das Enzym in schwach (essig-)saurer Lösung am wirksamsten sein.

Temperatur. Die obere Stabilitätsgrenze soll etwa 10^0 tiefer liegen als diejenige der Amylase.

Carubinase, Seminase.

Eine Reihe von einfachen und gemischten Mannanen sind beschrieben, aber wenige genügend genau definiert worden. So kommt es, dass über die Existenz eventueller spezifischer Enzyme noch kaum ein sicheres Urteil gefällt werden kann.

Unter den in höheren Pflanzen gefundenen Mannanen und Mannogalaktanen ist hinsichtlich seiner enzymatischen Spaltung besonders das Carubin (auch Caruban, Seminin[6]) oder Sekalin genannt) näher untersucht worden.

[1]) Siehe hierzu Reinitzer, H. 23, 175; 1897.
[2]) Gardiner, Proc. Roy. Soc. 62, 100; 1897.
[3]) Newcombe, Ann. of Bot. 13, 49; 1899.
[4]) Green, Ann. of Bot. 7, 93; 1893.
[5]) Reynolds Green, The Enzymes. Deutsch von Windisch, Berlin 1901.
[6]) Von Reiss (Chem. Ber. 22, 609; 1889) u. a. wird als Seminin ein reines Mannan bezeichnet und mit Paramannan identisch angenommen.

Das Carubin aus dem Samen des Johannisbrotbaumes (Ceratonia siliqua) liefert den Studien von Effront[1]) und Bourquelot und Hérissey[2]) zufolge bei der Hydrolyse d-Mannose neben wenig Galaktose, und wäre demnach als Galaktomannan anzusprechen.

Das zusammen mit dem Carubin im Johannisbrotsamen vorkommende Enzym hat Effront nachgewiesen und Carubinase genannt. Nach seinen Angaben kommt das Carubin auch in Roggen- und Gerstenkörnern vor; Bourquelot und Hérissey fanden es sowohl in Leguminosen (Medicago sativa, Trifolium repens, Trigonella), als auch in zahlreichen anderen Pflanzen, wie in Salep und in Orchideen. Sie nannten das Enzym Seminase.

Das Enzym lässt sich aus dem wässerigen Samenextrakt durch (das fünffache Volumen) Alkohol ausfällen.

Temperaturoptimum: Nach Effront 45°—50°; nach Bourquelot und Hérissey 35°—40°.

Aziditätsoptimum: Schwach saure Lösung.

Die Steinnuss (Phytelephas macrocarpa) soll in ihrem „Horneiweiss" nach Reiss, l. c., sowie nach Fischer und Hirschberger ein galaktosefreies Mannan enthalten. Bourquelot und Hérissey[3]) nahmen an, dass die Steinnuss ein besonderes Enzym enthält, welches dieses Mannan so angreift, dass es durch die Seminase weiter gespalten werden kann.

Auch in Phoenix soll ein auf die Mannane dieser Samen spezifisch wirkendes Enzym enthalten sein.

3. Hemizellulasen der Pilze und Bakterien.

Hier wäre der grösste Teil derjenigen Enzymwirkungen zu erwähnen, welche in der älteren Literatur den Zellulasen zugeschrieben worden ist. Die Spaltung wurde selten durch die entstehenden Zuckerarten charakterisiert, oft wurde sogar nicht reine Zellulose als Substrat verwendet, sondern Holz oder pflanzliche Organe, welche neben Zellulose reichlich andere höhere Kohlehydrate enthalten haben können und auf welchen nur Korrosionen beobachtet wurden. Als Ausgangspunkte für weitere Studien verdienen diese Angaben natürlich Beachtung[4]); einwandfrei nachgewiesen werden diese Enzyme aber erst durch Ermittlung und Isolierung der auftretenden hydrolytischen Spaltprodukte.

Ältere Angaben über die (vermutlich) enzymatische Zerstörung von pflanz-

[1]) Effront, C. r. 125, 38, 116; 1897.
[2]) Bourquelot und Hérissey, C. r. 129, 228, 391; 1899. — 130, 42, 340; 1900. — 133, 49; 1901. — Jl de Pharm. et de Chim. (6) 11, 104; 1900.
[3]) Bourquelot und Hérissey, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 10, 193; 1901. Soc. Biol. 55, 699; 1903.
[4]) Siehe hierzu R. Falck, Zerstörung des Holzes durch Pilze. Berlin, Springer 1916.

lichem Gerüstmaterial und Reservestoffen findet man bei Miyoshi[1]), De Bary (1886), Kean[2]), Wehmer[3]), Marshall Ward[4]), Newcombe[5]).

Auch Schellenberg[6]), dessen Gründlichkeit in botanischer Hinsicht anerkannt werden muss, beschränkt sich auf mikroskopische Beobachtung der Enzymwirkung und geht nicht auf die chemische Reaktion ein. Er nimmt die Existenz mehrerer Hemizellulasen (wenigstens vier nach seinen Untersuchungen) an.

Kellerman[7]) hat die Absonderung einer Zytase aus Penicillium pinophilum beobachtet. Nach Rudan[8]) scheidet das Myzel von Polyporus igniarius in verschiedenen Holzarten neben einem stärkelösenden auch ein zytolytisches Enzym ab.

Der einzige Forscher auf diesem Gebiet, welcher den Spaltprodukten und überhaupt den chemischen Vorgängen die erforderliche Aufmerksamkeit gewidmet hat, ist Pringsheim[9]). Er hat bei der Spaltung eines Mannanes aus Steinnussspänen durch eine aus Erde erhaltene (leider nicht näher definierte) Bakterienkultur das Auftreten einer Trimannose wahrscheinlich gemacht. Bestätigt sich dieser Befund, so ist er sehr bemerkenswert, da bisher nur Disaccharide, wie bei der Zellulose, noch nie aber Trisaccharide als enzymatische Abbauprodukte aufgefunden worden sind.

Hadromase.

Czapek[10]) nahm vor längerer Zeit an, dass im Holz eine ätherartige Verbindung der Zellulose mit dem „Hadromal“ vorkommt, und dass diese Verbindung durch ein besonderes, in holzzerstörenden Pilzen gefundenes Enzym, die „Hadromase“ gespalten wird. Da die Existenz des Hadromals zweifelhaft ist[11]), mag hier der Hinweis auf die betr. Literaturstelle genügen.

C. Inulinase.

An die Hemizellulasen wird hier die Inulinase angeschlossen, da das Inulin hinsichtlich seiner pflanzenphysiologischen Rolle etwa zwischen den Mannanen und der Stärke einzuordnen ist.

---

[1]) Miyoshi, Jahrb. wiss. Bot. 28, 227; 1885.
[2]) Kean, Bot. Gaz. 15, 170; 1890.
[3]) Wehmer, Zbt. Bakt. II, 2, 140; 1896.
[4]) Marshall Ward, Ann. of Bot. 12, 565; 1898.
[5]) Newcombe, Ann. of Bot. 13, 49; 1899.
[6]) Schellenberg, Flora 98, 257; 1908.
[7]) Kellerman, U. S. Dep. Agric. Bur. Plant. Ind. 118, 29; 1913.
[8]) Rudan, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen, 13, 375; 1917.
[9]) Pringsheim, H. 80, 376; 1912.
[10]) Czapek, Bot. Ber. 27, 141; 1899.
[11]) Siehe hierzu Grafe, Monatsh. f. Chemie 25, 1000; 1904. — Brown u. Tollens, Chem. Ber. 35, 1464; 1902.

Substrat: Das Inulin, gewöhnlich aus Knollen von Dahlien (und Helianthus tuberosus, Inula Helenium, Pyrethrum, Taraxacum), dargestellt, ist nach Tanret[1]) und Dean[2]) kein einheitlicher Stoff, sondern ein Gemenge mehrerer einander ähnlicher Körper. Tanret ist es gelungen (1893), das Inulin weitgehend zu reinigen. Tanret nimmt die Molekularzusammensetzung $30\,(C_6H_{10}O_5) + 5\,H_2O$ an. Auch sein Inulin enthielt nicht ausschliesslich Fruktose, sondern etwa $^1/_{12}$ d-Glukose. Neuere Ergebnisse von Irvine und Steele[3]), sowie von Karrer[4]) machen es aber wahrscheinlich, dass das Inulin das Polymerisationsprodukt einer reinen Anhydrofruktose ist. Ein Disaccharid ist bei der Spaltung von Inulin bis jetzt noch nicht nachgewiesen worden[5]).

Wolff und Geslin (C. r. 165) geben an, dass bei der enzymatischen Inulinspaltung Inulide als Zwischenprodukte entstehen, welche durch Hefe vergoren werden.

Die Spaltung in Fruktose wird durch verdünnte HCl bewirkt; die Magensalzsäure dürfte aber zu einer erheblichen Inulinspaltung nicht ausreichen[6]).

Vorkommen: Die Inulinase wurde von Green[7]) in Helianthus tuberosus entdeckt; sie befindet sich in ruhenden Samen im Zymogenzustand und wird bei der Keimung aktiviert. Vermutlich begleitet die Inulinase das Inulin in allen Monokotyledonen.

Darstellung: Besonders leicht kann man nach Green aus den fein gemahlenen Artischocken-Knollen das Enzym durch Extraktion mit Glyzerin gewinnen. Das Extrakt wird durch Dialyse gereinigt; die Spaltung des Inulins wurde von Green in pergamentenen Dialysierröhren nachgewiesen.

Die Verschiedenheit der Inulinase von der Amylase, welche Inulin nicht spaltet, ist sichergestellt.

In Pilzen und Bakterien scheint Inulinase recht verbreitet zu sein. Die ersten Versuche darüber verdankt man Bourquelot[8]); Dean[9]) und Boselli[10]) haben das Enzym in Schimmelpilzen nach der Züchtung auf inulinhaltigen Nährböden hervorrufen können.

Temperaturoptimum: (Pilzenzym) bei 55°.

Aziditätsoptimum: Aus Bourquelots und Bosellis Angaben ist zu schliessen, dass das Optimum des Pilzenzyms in sehr schwach saurer Lösung liegt.

---

1) Tanret, Bull. Soc. chim. (3) 9, 233; 1893.

2) Dean, Amer. Chem. Jl 32, 69; 1904.

3) Irvine und Steele, Jl Chem. Soc. 118, 1474; 1920.

4) Karrer und Lang, Helv. Chim. Acta, 4, 249; 1921.

5) Zur Chemie des Inulins und verwandter Kohlehydrate, wie Synanthrose, siehe H. Pringsheim, Die Polysaccharide, Berlin 1919; ferner Zemplén, Handb. d. bioch. Arbeitsmethoden 6, 23; 1912.

6) Ruth Okey, Jl Biol. Chem. 39, 149; 1919.

7) Green, Ann. of Bot. 1, 223; 1888.

8) Bourquelot, Bull. Soc. Mycol. France 10, 235. — C. r. 116, 1143; 1892.

9) Dean, Bot. Gaz. 35, 24; 1903.

10) Boselli, Ann. Inst. Pasteur 25, 695; 1911. — Siehe auch Colin, C. r. 170, 1010; 1920.

Lindner[1]) fand Inulinase auch in einzelnen Hefen, so in der Logoshefe, in Saccharomyces Marxianus, S. exiguus, S. Pombe.

Nach Avery und Glenn[2]) kommt Inulinase neben Saccharase und Amylase auch in Pneumokokken vor; Wirksamkeit zwischen pH = 5 und 8.

Auch in tierischen Organen soll *Inulinase* auftreten, nämlich nach Tanaka[3]) in Milz und Plazenta. Tschermak[4]) gibt an, dass die Inulinase im Darm von Kaninchen durch Inulinfütterung stark vermehrt wird. Im menschlichen Verdauungstraktus wird das Inulin vermutlich durch die Bakterien hydrolysiert.

Im Verdauungstraktus von Helix pomatia wird nach Bierry[5]) neben anderen höheren Kohlehydraten (vergl. S. 73) auch Inulin gespalten.

Analyse: Fruktose lässt sich neben Inulin nach der von Benedict[6]) angegebenen Modifikation der Lewis-Benedictschen Pikrat-Methode bestimmen.

Über die Abspaltung der Fruktose aus Raffinose, Gentianose und Stachyose siehe Kap. 5 und 6.

D. Pektinasen.

Hydrolysierende Enzyme der Gummiarten, Pflanzenschleime und Pektine.

Über die enzymatische Spaltung der obigen Kohlehydratgruppen ist noch äusserst wenig bekannt, obwohl das Studium derselben in mancher Hinsicht Interesse verdienen würde. So hat man z. B. noch kein Enzym gefunden, welches den Hefengummi, ein in den Kulturhefen reichlich vorkommendes Kohlehydrat, welches aus etwa gleichen Teilen Mannose und Glukose besteht, in seine Bestandteile zerlegt.

Zu den Pflanzenschleimen wird Agar-Agar gezählt, ein meist aus Florideen gewonnener Rohstoff, welcher neben anderen Kohlehydraten auch Gelose enthält. Die Gelose scheint ein Galaktan zu sein, ob ein reines oder gemischtes, lässt sich noch nicht sagen. Sie wird durch Jod violett gefärbt.

Gran[7]) hat einen Bazillus beschrieben und Bacillus gelaticus genannt, welchem er eine spezifisch-spaltende Wirkung auf Gelose zuschreibt. Durch die Einwirkung des Bac. gelaticus bezw. des darin enthaltenen Enzyms (?)

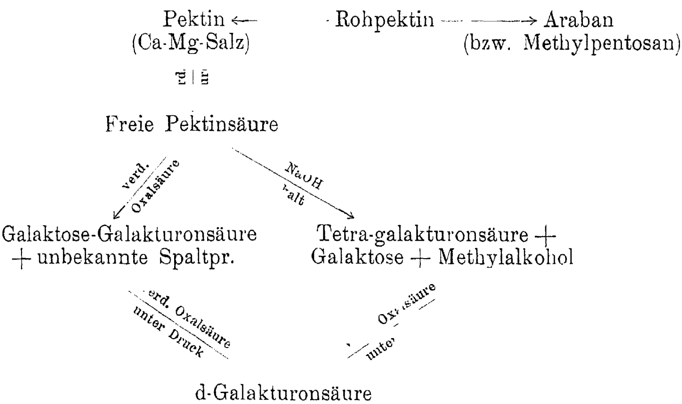
Gelase,

sollen reduzierende Stoffe auftreten, unter Verschwinden der Jodreaktion. Nach Bierry und Giaja[8]) hat Agar-Agar in Geleeform in Berührung mit den Verdauungssäften von Helix, Astacus, Homarus vulgaris u. a. niemals, auch nicht nach Wochen, reduzierenden Zucker ergeben.

[1]) Lindner, Woch. f. Brau. 17; 1900.
[2]) Avery und Glenn, Jl of exp. med. 32, 583; 1920.
[3]) Tanaka, Biochem. Zs 37, 249; 1911.
[4]) v. Tschermak, Biochem. Zs 45, 452; 1912.
[5]) Bierry, C. r. 150, 116; 1910. — Biochem. Zs 44, 402; 1912.
[6]) Benedict, Jl Biol. Chem. 34, 203; 1918.
[7]) Gran, Biochem. Zbt 1, Nr. 399; 1903.
[8]) Bierry und Giaja, Biochem. Zs 40, 386; 1912.

Eigentliche Pektinase (pektinspaltendes Enzym).

Substrat: Über die von Braconnot, Frémy und Payen entdeckten Pektine höherer Pflanzen, besonders der Zuckerrübe[1]), hat die letzte Zeit wesentliche Aufschlüsse gebracht. Nachdem schon Tollens und Zeisel die Gegenwart von Karboxylgruppen in Pektinen erkannt hatten, gelang es v. Fellenberg[2]) zu zeigen, dass Pektine die Methylester der Pektinsäuren sind, welche durch Wasserstoffionen und durch ein Enzym hydrolysiert werden. F. Ehrlich[3]) konnte dann das Rohpektin in ein Araban und eine eigentliche Pektinsäure zerlegen; nach seinen Untersuchungen ist das Pektin das komplexe Kalzium-Magnesiumsalz einer Anhydro-Arabinogalaktose-Methoxy-tetragalakturonsäure; die Spaltung wird durch folgendes Schema veranschaulicht[4]):



HCO
|
HCOH
|
HOCH
|
HOCH
|
HCOH
|
COOH

Die d-Galakturonsäure (siehe nebenstehende Formel) ist aus dem Pektin der Zitronenschalen 1917 von Suarez isoliert worden. Sie geht durch Oxydation in Schleimsäure über.

Mit Alkali liefert Pektin ausser Methylalkohol nach Tutin (Biochem. Jl 15) auch Azeton.

[1]) Besondere Pektinstoffe aus Meeresalgen, die der Arabonsäure nahestehen, hat Kylin (H. 94, 412; 1915) isoliert.

[2]) v. Fellenberg, Mitt. Schweizer Gesundheitsamt, 5—8, 1914—1916. — Biochem. Zs 85, 118; 1917.

[3]) F. Ehrlich, Chem. Ztg. 41, 197; 1917.

[4]) Eine gute Übersicht über den Stand der Pektinchemie hat 1917 Neuberg gegeben (Zs Ver. deutsch. Zuckerind. 67, 463; 1917).

Vorkommen: Ein Enzym, welches Pektinstoffe in Zucker spaltet, haben Bourquelot und Hérissey[1]) zuerst in gekeimter Gerste gefunden, wo es zugleich mit Amylase vorkommt. Der Umstand, dass Pektine durch Speichel nicht gespalten werden, zeigt, dass die „Pektinase“ von der Amylase verschieden ist.

Zahlreiche Bakterien vermögen Pektine zu hydrolysieren[2]). Die Abtrennung des Enzyms von der lebenden Zelle hat Jones[3]) durchgeführt, indem er die Zellen von Bac. carotovorus bei 54° tötete, während nach seinen Angaben das Enzym erst bei 62° inaktiviert wird.

Beyerinck und van Delden[4]) haben in Granulobacter. pectinivorum eine Pektinase nachgewiesen.

Darstellung: Jones hat aus dem von ihm untersuchten Bac. carotovorus ein Enzympräparat durch Alkoholfällung erhalten.

Aziditätsoptimum: Das Maximum der Stabilität und der Wirksamkeit scheint in neutraler Lösung zu liegen.

Gifte: Chloroform und Phenole hemmen nicht.

E. Anhang: Pektase.

Nach Frémy[5]) ist die Koagulation von Fruchtsäften eine enzymatische Reaktion. Der Vorgang, welcher der Koagulation zugrunde liegt, ist noch nicht aufgeklärt. Die Auffassung, die man sich von der Wirkung der Pektase gebildet hat, ist offenbar von den herrschenden Theorien und Hypothesen über die besser bekannten enzymatischen Koagulationen durch Thrombin und Chymosin stark beeinflusst.

Unter den neueren Arbeiten über Pektase sind diejenigen von Bertrand und Mallèvre, sowie von Bourquelot und Hérissey[6]) zu erwähnen.

Die erstgenannten Forscher kamen zunächst[7]) zum Ergebnis, dass zur Koagulation durch Pektase die Gegenwart löslicher Salze von Kalzium, Strontium oder Barium notwendig ist und nehmen an, dass das Koagulum aus einem Pektat des Kalziums (bzw. einer der alkalischen Erden) besteht.

Die enzymatische Umwandlung selbst wird nach Goyaud[8]) von der Gegenwart von Kalziumsalzen qualitativ nicht beeinflusst. Die Lösung kann nach seinen Befunden ebensowohl Kalium enthalten; Kalziumsalze bringen

[1]) Bourquelot und Hérissey, Soc. Biol. 50, 777; 1898. — Bourquelot, Jl de Pharm. et de Chim. 1899.

[2]) Siehe Lafars Hdbch. d. techn. Mykologie, III, S. 269, 1904, Kapitel X: Pektingärung.

[3]) Jones, Zbt Bakt. II, 14, 257; 1905.

[4]) Beyerinck und van Delden, Akad. v. Wetensch. Amsterdam 12, 2, 673; 1904.

[5]) Frémy, Jl de Pharm. 26, 392; 1840.

[6]) Bourquelot und Hérissey, Jl de Pharm. et de Chim. 8, 145; 1899.

[7]) Bertrand und Mallèvre, C. r. 119, 1013; 1894.

[8]) Goyaud, C. r. 135, 537; 1902.

die Reaktion nur zur Erscheinung, indem durch sie unlösliches Kalziumpektat entsteht.

Vorkommen: Die grosse Verbreitung der Pektase in der Pflanzenwelt ist durch eine Mitteilung von Bertrand und Mallèvre[1]) bekannt geworden. Aus der gleichen Mitteilung gehen auch die grossen Verschiedenheiten im Pektasegehalt der verschiedenen Arten und der Organe einer und derselben Art hervor. Bertrand gibt nachstehende Reihenfolge an, die festgestellt wurde, indem man eine gleiche Menge Pflanzenauszuges auf eine 2%ige, wässerige Pektinlösung wirken liess und die zur Koagulation erforderliche Zeit mass. (B. = Blätter; Fr. = Frucht; W. = Wurzel; Sch. = Schössling.)

Solanum Lycopersicum, Fr. . . .	48 Std.	Syringa vulgaris, B. . .	20 Minuten
Vitis vinifera, nahezu reife Fr. .	24 „	Ailanthus glandulosa, B.	20 „
Rheum rhaponticum	22 „	Daucus carota, junge W.	15 „
Ribes rubrum	15 „	Zea Mays, B.	
Marchantia polymorpha	$2^1/_2$ „	Iris florentina, B. . . .	
Daucus carota, ausgewachs. W. .	2 „	Trifolium pratense, Sch.	
Delphinium Staphisagria	$1^1/_2$ „	Medicago sativa, Sch. .	
Ginkgo biloba, B.	$^1/_2$ „	Solanum tuberosum, B. .	weniger als 1 Min.
		Brassica napus, B. . .	
		Lolium perenne, B. . .	

Frémy (l. c.) unterschied eine lösliche Pektase, wie sie besonders in Rüben vorkommt, und unlösliche Pektasen in sauren Früchten. Bertrand und Mallèvre[2]) wiesen hingegen lösliche Pektase auch in Säften von Äpfeln, Birnen und anderen Früchten nach und fanden, dass auch in diesen Koagulation erzielt wird, wenn man eine geeignete Menge verdünnten Alkalis zugibt.

Darstellung: Bertrand und Mallèvre stellten Pektasepräparate aus Klee und Luzerne durch Alkoholfällung dar, die sie — allerdings ohne Angabe von Zahlenwerten — als sehr wirksam bezeichneten.

Aziditätsoptimum: Die Säureempfindlichkeit der Pektase wurde schon von Bertrand und Mallèvre hervorgehoben. Ihre Angabe, dass Pektase bei Neutralität am besten wirkt, konnte vom Verfasser und Svanberg[3]) allerdings nicht bestätigt werden. Nach unseren eigenen Versuchen an den Säften reifer Beeren von Ribes nigrum, Ribes rubrum und Ribes grossularia liegt das Aziditätsoptimum bei pH = 4,3. Die Säfte dieser reifen Beeren selbst zeigten ziemlich übereinstimmend eine Azidität = 2,8 bis 2,96.

Aus der genannten Arbeit mag folgende Versuchsreihe als Beispiel angeführt werden. Durch Auspressen von Ribes rubrum wurde direkt der zu untersuchende Saft gewonnen.

[1]) Bertrand und Mallèvre, C. r. 121, 726; 1895.
[2]) Bertrand und Mallèvre, C. r. 120, 110; 1895.
[3]) Euler und Svanberg, Biochem. Zs 100, 271; 1919.

Anzahl ccm 2 n NaOH zu 15 ccm Saft	pH	Koagulationszeit; fest und homogen innerhalb
1,5	3,85	6 Stunden
1,75	4,05	3,5 „
2,0	4,20	}
2,25	4,42	} 3 „
2,5	4,60	}
2,75	4,80	3,5 „

Methodik: Genauere Messungen des Koagulationsverlaufes wären mit Dämpfungs-Viskosimetern auszuführen [1]. Bevor jedoch der chemische Vorgang der Pektase-Wirkung, besonders die Rolle der Aktivatoren, genauer bekannt ist, sind solche quantitativen Viskositätsmessungen vielleicht noch verfrüht.

[1]) Eingehende Untersuchungen über die Gelatinierung und über die Salzbildung von Pektin unter Berücksichtigung physikalisch-chemischer Gesichtspunkte verdankt man Dorothy Haynes, Biochem. Jl 8, 553; 1914 und Sven Odén, Intern. Zs f. Biol. 3, 83, 1917 und Bot. Ber. 34, 648; 1916.

4. Kapitel.

Amylasen.
Poly-(Okto-, Hexa- etc.)-Amylasen.

Wir wollen in diesem Kapitel diejenigen Enzyme behandeln, welche die Bestandteile der Stärke, ferner das Glykogen und endlich die nächsten Abbauprodukte dieser Stoffe zu spalten vermögen.

Zu den Schwierigkeiten, welche die wechselnden Verunreinigungen der Enzyme verursachen, kommt bei den Versuchen mit Stärke noch oft die Komplikation, die ein nicht einheitliches Substrat mit sich bringt.

In zahlreichen früheren Arbeiten hat man der Beschaffenheit der Stärke nicht die nötige Aufmerksamkeit geschenkt; eine genaue Definition des Substrates ist bei Untersuchungen über enzymatische Stärkespaltung besonders wichtig.

1. Substrat.

Stärke. Die Rohstärken des Handels enthalten im Mittel etwa 15% Wasser, welches sich nur schwer entfernen lässt. Die Verunreinigungen durch kleine Mengen Pflanzeneiweiss sind gering. Für enzymatische Arbeiten verwendet man gewöhnlich 1—2%ige „Lösungen" von „löslicher Stärke", welche nach verschiedenen Methoden, meist nach Lintner, hergestellt werden.

Es kann als feststehend angesehen werden, dass diese „löslichen Stärken" — auch wenn sie kein oder nur ein minimales Reduktionsvermögen aufweisen — keine einheitlichen Substanzen darstellen, sondern dass sie, wie das zu ihrer Herstellung verwendete Ausgangsmaterial, mehrere Substanzen, oder richtiger Substanzgruppen enthalten, die von verschiedenen Forschern verschieden bezeichnet worden sind. Nach dem Vorschlag von Maquenne und Roux fasst man diese Substanzen in zwei Gruppen unter den Namen „Amylose und Amylopektin" zusammen. Indessen ist es wohl möglich, dass es sich hier besonders um Unterschiede im Polymerisationsgrad bzw. Dispersitätsgrad handelt, wie Lintner mehrfach betont hat.

Die Amylosen sind charakterisiert durch ihre rein blaue Jodreaktion, durch ihren geringen Einfluss auf die innere Reibung des Wassers und die Wiederausscheidung aus den Lösungen beim Abkühlen (Retrogradation).

Das „Amylopektin“ gibt mit Jod eine rotviolette Färbung, bildet mit Wasser Kleister, ruft also eine hohe Viskosität hervor. Chemisch ist es nach Samec[1]) charakterisiert durch seinen Gehalt an PO_4.

Für die Darstellung der Amylose und des Amylopektins sind von Roux bzw. von Gatin-Gruzewska Verfahren angegeben worden; entschiedene Fortschritte in dieser Hinsicht verdankt man Malfitano und Moschkoff[2]) und Samec[3]), wenn auch eine befriedigende Trennung der Stärkekomponenten noch nicht gelungen ist.

Bei der enzymatischen Spaltung der Amylose tritt als einziges Endprodukt Maltose auf. Dieser Abbau des Amylosemoleküls geht über Zwischenprodukte, welche als Dextrine bezeichnet wurden und erst in letzter Zeit eine erfolgreiche Bearbeitung gefunden haben.

Schardinger ist es 1903 gelungen, durch Einwirkung des Bacillus macerans aus der Stärke neben Azeton noch kristallisierende Kohlehydrate zu gewinnen, welche durch H. Pringsheim[4]) eingehend studiert und ihrer Zusammensetzung nach aufgeklärt worden sind. Pringsheim bezeichnet diese „kristallisierten Dextrine“ Schardingers als Amylosen.

α-Dextrin = Tetraamylose $(C_6H_{10}O_5)_4 + 2\ C_2H_5OH$ $[\alpha]_D^{24} = +158{,}3^0$
β-Dextrin = Hexaamylose $(C_6H_{10}O_5)_6 + 9\ H_2O$ $[\alpha]_D^{24} = +138{,}9^0$.

Durch Azetylierung der Tetraamylose entsteht das Hexaazetat einer Diamylose, aus welchem beim Verseifen das Kohlehydrat $(C_6H_{10}O_5)_2 + 2\ H_2O$ hervorgeht, und in analoger Weise wird aus der Hexaamylose eine Triamylose $(C_6H_{10}O_5)_3 + 4\ H_2O$ gewonnen.

Pringsheim unterscheidet nunmehr also die folgenden Produkte[5]):

α-Reihe.	Temp.	$[\alpha]_D$
Oktamylose $[(C_6H_{10}O_5)_2]_4 + 4\ C_2H_5OH$	20	$+139{,}2^0$
α-Hexaamylose $[(C_6H_{10}O_5)_2]_3 + ?\ C_2H_5OH$	20	$+132{,}2^0$
Tetraamylose $[(C_6H_{10}O_5)_2]_2 + 2\ C_2H_5OH$	24	$+138{,}6^0$
Diamylose $(C_6H_{10}O_5)_2 + 2\ H_2O$	24	$+136{,}6^0$.

β-Reihe.	Temp.	$[\alpha]_D$
β-Hexaamylose $[(C_6H_{10}O_5)_3]_2 + 9\ H_2O$	24	$+157{,}9^0$
Triamylose $(C_6H_{10}O_5)_3 + 4\ H_2O$	24	$+151{,}8^0$.

[1]) Samec, Kolloidchem. Beih. 6, 23; 1914.

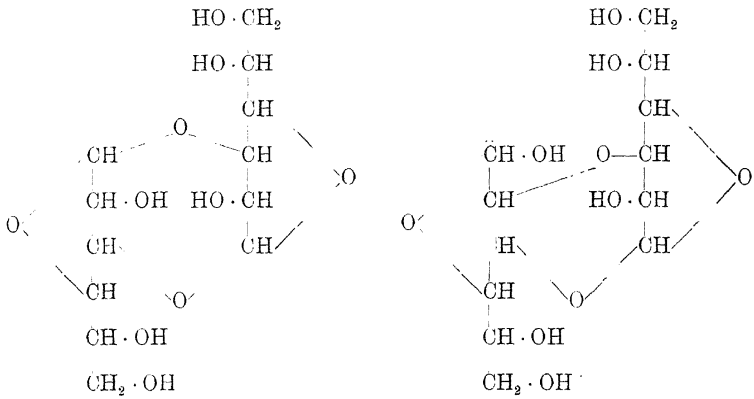
[2]) Malfitano und Moschkoff, C. r. 150, 710; 1910. — 151, 817; 1910.

[3]) Samec und v. Hoefft, Kolloidchem. Beih. 5, 141; 1913. — Über die PO_4-Verbindung in der Stärke siehe Northrop und Nelson, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 472; 1915.

[4]) Pringsheim und Langhans, Chem. Ber. 45, 2533; 1912. — Pringsheim und Eissler, ebd. 46, 2959; 1913 und 47, 2565; 1914.

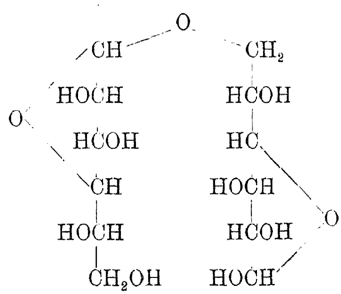
[5]) Siehe Pringsheim, Die Polysaccharide. Berlin 1919. — Es sei hier auch auf die neueren wertvollen Beiträge zur Stärkechemie verwiesen, welche man Karrer und seinen Mitarbeitern verdankt (Helv. 3 und 4; 1920, 1921).

Beim Azetylieren der höheren Amylosen mit Schwefelsäure tritt neben einer Depolymerisation auch noch eine Gruppenverschiebung ein, bei welcher unter Erhaltung einer Mindestmolekulargrösse wenigstens eine Aldehydgruppe frei wird. Pringsheim formulierte deshalb den Übergang der Diamylose in die Isodiamylose zunächst so:



Diamylose Isodiamylose

Nun ist seither durch die Arbeiten von Irvine und Dick[1]) sowie von Haworth und Leitch[2]) die Formel der Maltose endgültig festgelegt worden:



Ferner haben Karrer und Nägeli[3]) nachgewiesen, dass die α-Diamylose ein Anhydrid der Maltose ist, und diesem Befund muss jedenfalls die Diamyloseformel Rechnung tragen.

Pringsheim (l. c. S. 90) stellt sich den Stärkeabbau folgendermassen vor: „Zuerst erfolgt unter der schwachen Einwirkung von Säure oder unter der eines wenig aktiven Enzyms, wie z. B. des Auszuges aus ungekeimter Gerste, eine reine Löslichmachung durch blosse Depolymerisation, bei welcher

---

[1]) Irvine und Dick, Soc. 115, 593; 1919.
[2]) Haworth und Leitch, Soc. 115, 809; 1919.
[3]) Karrer und Nägeli, Helv. 4, 169; 1921.

die Blaufärbung durch Jod noch erhalten bleibt. Bei stärkerer Einwirkung von Säure oder durch ein aktiveres Enzym findet nun bei fortschreitender Depolymerisation eine Freilegung von Aldehydgruppen statt, welche unter gleichzeitiger Abnahme der Intensität der Jodfärbung die Ursache für die nach und nach zunehmende Reduktionskraft der sich bei stärkerem Abbau bildenden Dextrine darstellt. Weiterhin verschwindet die Jodfärbung ganz, ohne dass schon Maltose gebildet zu sein braucht, und man gelangt so zu den sog. Maltodextrinen. Naturgemäss laufen die beiden Phasen des Stärkeabbaues, die Depolymerisation und die Molekularverschiebung mit Freilegung der Aldehydgruppe nebeneinander her, und so erklärt es sich, dass weder durch den Säure- noch durch den fermentativen Abbau bisher jemals einheitliche Produkte gewonnen werden konnten; es handelt sich immer um Gemische von verschiedenem Polymerisationsgrad unter gleichzeitiger Beimengung von reduzierenden Dextrinen, die wiederum von verschiedener Molekulargrösse sein können."

Weizen-, Mais- und Reisstärke, welche mit sehr verdünntem Alkali gewaschen worden sind, zeigen nach Sherman, Walker und Caldwell[1]) die gleiche Verdaulichkeit, und zwar sowohl durch Speichel- und Pankreas- als durch Malzamylase. Grössere Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit hat Pauletig[2]) gefunden.

Da weder die rohe Stärke, noch die „lösliche" Stärke eine einheitliche Substanz ist[3])[4]), so muss das Substrat der enzymatischen Spaltung durch sein chemisches Verhalten oder physikalische Konstanten charakterisiert werden. Wichtige Anhaltspunkte liefert die Aufnahmefähigkeit für Jod, und zwar wird man am besten die Jodaufnahme gelöster Stärke aus einer Benzollösung bestimmen; diese Jodaufnahme ist vom Verf., K. Myrbäck und Stig Bergman näher untersucht worden[5]).

Unter den diagnostisch brauchbaren physikalischen Eigenschaften der Stärkepräparate bzw. ihrer Lösungen ist besonders die Viskosität zu nennen, welche neuerdings von Samec[6]) eingehend untersucht worden ist.

Die röntgenspektrographischen Untersuchungen nach der Debye-Scherrerschen Methode[7]) bringen vielleicht weitere Aufschlüsse über den Bau der hochpolymerisierten Kohlehydrate. Karrer[4]) betrachtet „lösliche Stärke als Polymeres der Diamylose".

---

[1]) Sherman, Fl. Walker und Mary L. Caldwell, Jl Amer. Chem. Soc. 41, 1123; 1919.

[2]) Marius Pauletig, H. 100, 74; 1917.

[3]) Dieser Umstand hindert wohl auch die Kristallisation der „löslichen Stärke".

[4]) Siehe Karrer und Nägeli, Helv. 4, 263; 1921.

[5]) Euler und Myrbäck, Lieb. Ann. 426; 1922. — Euler und Bergman, Chem. Ber. 55; 1922. — Über Jodverbindungen der Hexa- und Tetraamylosen siehe Pringsheim und Eissler, l. c.

[6]) Samec, Kolloidchem. Beih. 6, 23; 1914.

[7]) Scherrer, Physik. Zs 17, 277; 1916 und 18, 291; 1917. — R. O. Herzog und Jancke, Chem. Ber. 53, 2162; 1920.

Glykogen liefert bekanntlich ebenso wie die Stärke als Endprodukt der diastatischen Spaltung Maltose; auch das Glykogen dürfte als eine Polyamylose zu betrachten sein, aber von anderem Polymerisationsgrad als Stärke [1]). Es wird durch den Bacillus macerans zu den gleichen Amylosen abgebaut wie Stärke (Pringsheim).

Glykogen löst sich zu einer opaleszierenden Flüssigkeit; es ist polymerisiert zum Molekulargewicht rund 100000. Glykogen nimmt, wie Stärke, Jod auf, und zwar unter Rotbraun-Färbung. Die Zusammensetzung ist wie diejenige der Stärke $(C_6H_{10}O_5)_x$. Während es durch Säuren leicht in Glukose gespalten wird, ist es Alkalien gegenüber ausserordentlich widerstandsfähig. Reines Glykogen reduziert ebensowenig wie Stärke.

Ausser dem tierischen Glykogen, der Leber und der Muskeln, kennt man noch einen demselben sehr nahestehenden, vielleicht mit ihm identischen pflanzlichen Stoff. Dieses Glykogen findet sich zwar nicht in grünen Pflanzen, ist aber in Pilzen, besonders in Hefen, ferner in Mucorarten und Bakterien sehr verbreitet.

2. Einteilung der Amylasen.

Eine Scheidung der stärkeabbauenden Enzyme in die Katalysatoren der verschiedenen Reaktionsphasen ist bis jetzt nicht gelungen. Zwar haben manche Forscher, nicht ohne Grund, ein stärkelösendes und ein stärkeverzuckerndes Enzym angenommen und auch in letzterem wiederum neben einer eigentlichen Amylase noch Dextrinasen vermutet; man würde demgemäss unter Einführung einer rationellen Nomenklatur zwischen Polyamylasen und niedrigeren Amylasen (Hexa-amylasen, Tetra-amylasen usw.) zu unterscheiden haben. Eine solche Trennung ist bis jetzt aber noch hypothetisch. Man hat die betr. Enzyme im Bacillus macerans zu suchen.

Wir teilen die Amylasen deshalb, wie andere Enzyme, nach ihrem natürlichen Vorkommen ein, und zwar in:

A. Tierische Amylasen,
B. Pflanzliche Amylasen.

Beide Enzymgruppen bilden Maltose als Endprodukt [2]). Wesentliche Unterschiede dürften zwischen den tierischen und pflanzlichen Polyamylasen nicht bestehen. Vielleicht stellen aber künftige genauere Messungen weitere Differenzen bezüglich Stabilität, Wirkungsbedingungen und Zusammensetzung fest [3]).

[1]) Siehe Pringsheim, Chem. Ber. 49, 364; 1916. — Karrer und Nägeli, Helv. 4, 263; 1921.

[2]) Musculus und v. Mering, H. 2, 403; 1878. — v. Mering, H. 5, 185; 1881. — Külz, Pflüg. Arch. 24, 81; 1881. — Karrer und Nägeli, l. c.

[3]) Verschiedenheiten zwischen Speichelamylase und Malzamylase sind schon von Defresne (C. r. 89, 1070, 1879) und von Bourquelot (C. r. 104, 71, 1887) angenommen worden.

A. Tierische Poly-Amylasen.

1. Speichel-Amylase (Ptyalin[1]).

Die stärkelösende Wirkung des Speichels ist 1831 von Leuchs entdeckt und dann von Schwann untersucht worden[2]).

Vorkommen: Beim Menschen scheint die Hauptmenge der Speichelamylase von der Parotis geliefert zu werden, während die Glandula submaxilaris verhältnismässig wenig Amylase abscheidet[3]). Das gleiche trifft im allgemeinen auch bei Tieren zu, sofern ihr Speichel überhaupt Amylase enthält.

Immerhin steht nunmehr wohl fest, dass Amylase auch bei neugeborenen Kindern sowohl in der Parotis (Zweifel, Korowin) als in der Submaxillaris[4]) vorkommt. Die Stärkeverdauung bei jungen Kindern hat Shaw[5]) untersucht.

Im normalen menschlichen Speichel scheint der Amylasegehalt unregelmässig zu schwanken; siehe hierzu Schultz in Oppenheimers Handb. d. Biochemie 3, 1, 27; 1908. Wesentlich für die Beurteilung dieser Verhältnisse ist der Umstand, dass der Salzgehalt des Speichels wechselt.

Pathologische Veränderungen beim menschlichen Speichel: Im allgemeinen sind hier keine grösseren Abweichungen von der normalen Amylaseproduktion oder sonst auffallende Resultate gefunden worden[6]). Kleinere Schwankungen können oft in Ungleichheiten der Versuchsbedingungen (Azidität, Salzgehalt) ihren Grund haben.

Bei Diabetes nach Wisel keine Veränderung. Auch bei Verdauungsstörungen des Darmes konnte Burger[7]) keine Abnahme der Speichelamylase nachweisen. Nach Jawein[8]) kein Effekt bei Fieber und bei Tuberkulose. Bei Geisteskrankheiten fand Christiani[9]) die Speichelamylase vermehrt.

Tierischer Speichel: Starke Amylasewirkungen sind beim Schwein gefunden worden, ferner bei Ratten.

Bei Pflanzenfressern ist im allgemeinen die Amylasewirkung des Speichels ziemlich schwach, so z. B. beim Pferd (Ellenberger und Hofmeister, Hayden[10])). Beim Rind hat C. C. Palmer[11]) starke zeitliche und individuelle Schwankungen gefunden. Die Amylase soll aus dem Blut stammen. Siehe auch Blutamylase S. 108.

---

[1]) Die Bezeichnung Ptyalin soll von Berzelius stammen.

[2]) Ältere Schriften über Speichelamylase siehe bei Schlesinger, Virch. Arch. 125, 146.

[3]) Siehe Grützner, Pflüg. Arch. 16, 105; 1877. — Mestrezat, Bull. Soc. Chim. (4) 3, 711; 1908.

[4]) Schilling, Jahrb. Kinderheilk. 58, 518; 1903. Siehe daselbst auch ältere Arbeiten.

[5]) Shaw, Albany Med. Ann. 1904 nach Biochem. Zbt. 2, 1458; 1904.

[6]) Litmanowicz und E. Müller, Zbt. Physiol. u. Path. d. Stoffw. N. F. 4, 81, 1909.

[7]) Burger, Münch. med. Wochenschr. 43, 220; 1896.

[8]) Jawein, Wiener med. Presse 1892, 578. Zitiert nach Oppenheimer.

[9]) Christiani, Zbt. med. Wiss. 506; 1905.

[10]) C. E. Hayden, Amer. Jl Physiol. 45, 461; 1918.

[11]) C. C. Palmer, Amer. Jl Physiol. 41, 4; 483; 1916.

Bei Fleischfressern soll Amylase im Speichel nach Mendel und Carlson oft ganz fehlen [1]. Bei der Katze wird Amylase von der Gl. submaxillaris ausgeschieden. Kaninchen sezernieren A. aus der Parotis oder auch überhaupt nicht [2]. Fische enthalten nach Krukenberg A. im Speichel; Schlangen nach Launay (1903) nicht.

Darstellung: Die Reindarstellung des stärkespaltenden Speichelenzyms ist noch nicht befriedigend ausgearbeitet. Cohnheim hat schon vor langer Zeit vorgeschlagen, das „Ptyalin" durch Kalziumtriphosphat zu adsorbieren und dann den Niederschlag mit Wasser auszuziehen; dabei geht das Enzym in Lösung und kann dann mit Alkohol gefällt werden. — Man kann auch den Speichel zunächst mit Alkohol fällen oder aussalzen und dann diese Fällung mit Wasser digerieren, wobei ein Teil der Verunreinigungen ungelöst bleibt. — Auch durch Glyzerinextraktion der Mundschleimhaut erhält man in gewissen Fällen brauchbare Präparate.

Aziditätsbedingungen: Wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, ist die Wirkung der Speichelamylase in erster Linie von der Anwesenheit von Neutralsalzen, und zwar ihrer Anionen, abhängig. Je nach der Natur dieser Neutralsalze liegt das Gebiet der optimalen Azidität.

Die ersten, nach modernen Gesichtspunkten ausgeführten Versuche verdankt man E. W. Ringer und van Trigt [3], welche die Lage der optimalen Reaktion in Phosphat- und Azetatmischungen bei 37° zu pH = 6,00 fanden, und zwar ziemlich übereinstimmend mit der Zuckerreduktionsmethode von Bertrand und mit der Jodmethode. In Zitratlösungen zeigte sich die Lage der optimalen Reaktion von der Konzentration des Puffers abhängig.

Michaelis und Pechstein [4] fanden nach Salzzusätzen folgende Wirkungsoptima:

Salz:	Phosphat, Azetat, Sulfat	Chlorid, Bromid	Nitrat
pH:	6,1 bis 6,2	6,7	6,9.

Die gleichen Autoren fanden empirisch folgende Regel: Je kleiner die Affinität eines Anions zur Diastase ist, bei um so saurerer Reaktion liegt das Wirkungsoptimum der Diastasekomplexverbindung.

Norris fand bei seinen Versuchen mit Glykogen als optimale Azidität pH = 6 bei 37°.

In neuester Zeit hat Amandus Hahn [5] den Einfluss von Puffern bzw. Neutralsalzen auf das Aziditätsoptimum untersucht. Er arbeitete mit 0,013 Mol. Phosphat bzw. 0,01 Mol. Azetatpuffer und 0,2 Mol. Salzzusätzen. Für Speichelamylase fand Hahn die Optima:

[1] A. J. Carlson und Chittenden, Amer. Jl Physiol. 26, 169; 1910.
[2] Ryan, Amer. Jl Physiol. 24, 234; 1909.
[3] W. E. Ringer und van Trigt, H. 82, 484; 1912.
[4] Michaelis und Pechstein, Biochem. Zs 59, 77; 1914.
[5] A. Hahn und Michalik, Zs f. Biol. 73, 10; 1921.

bei Phosphatpuffer pH = 6,4 bis 6,5
bei Azetatpuffer 5,6.

Der Optimalpunkt pH = 6,5 wird durch die sehr eingehende Untersuchung von E. Ernström[1]) bestätigt, dessen Arbeit die Fig. 6 entnommen ist[2]). Die Kurve gilt bei 37° für 0,058 n. Phosphat und 0,017 n. NaCl.

1 ccm Enzymlösung + 20 ccm 0,29 n. Phosphatlösung + 100 mg NaCl + 50 ccm 2%ige Stärkelösung, alles verdünnt auf 100 ccm.

Als natürliche Azidität des Speichels wird von Michaelis und Pechstein pH = 6,9 angegeben.

Neutrale Alkalisalze verschieben nach Hahn[3]) bei Speichelamylase (wie auch bei Malzamylase) den isoelektrischen Punkt nach der sauren Seite, und

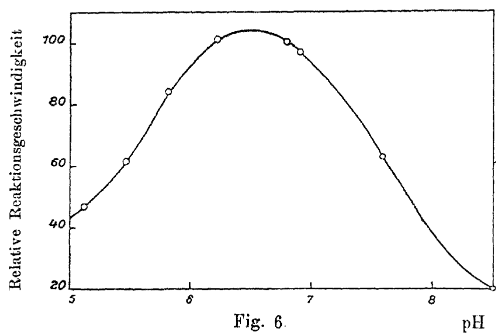


Fig. 6.

zwar soll die Verschiebung durch Na-Salze stärker sein als durch K-Salze. Michaelis und Pechstein (l. c.), welche den isoelektrischen Punkt aller Salz-Amylase-Komplexe zwischen 10^{-5} und 10^{-6} fanden, heben die Schwierigkeit hervor, einen isoelektrischen Punkt der Speichelamylase mit der bei anderen Enzymen möglichen Genauigkeit zu bestimmen.

Salzwirkung: Völlig salzfreie Speichelamylase ist unwirksam auf Stärke[4]). Wirksam wird sie erst durch ihre Verbindung mit Neutralsalzen; jede der entstehenden Enzym-Salzverbindungen hat ganz charakteristische Eigenschaften, welche überwiegend von der Natur des Salzanions abhängen. Michaelis (Monographie, S. 75) fügt diesen Resultaten folgendes zu:

„Die Vereinigung der Amylase mit den einzelnen Anionenarten zu den wirksamen Komplexen stellt eine unvollständige chemische Reaktion dar, die

[1]) E. Ernström, H. 117; 1921.

[2]) Eine Extrapolation dieser Kurve zeigt, dass Ptyalin im Magen höchstens 3% seiner maximalen Wirksamkeit entfalten kann, also praktisch unwirksam ist; zu diesem Resultat ist, soweit die damaligen Anschauungen und Methoden Schlüsse gestatteten, Hammarsten schon 1871 gelangt. Vergl. hierzu Pastore, Atti Acc. d. Lincei 29, 271; 1920.

[3]) A. Hahn und Harpuder, Zs f. Biol. 71, 287; 1920.

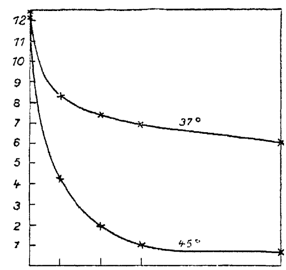
[4]) Norris (Biochem. Jl 7, 26 und 622; 1913) war mit Glykogen als Substrat zum gleichen Ergebnis gekommen. — Dialyse inaktiviert nicht nur durch Salzentziehung (Olsson).

zu einem Gleichgewicht führt. Die Affinität der Amylase zu den einzelnen Anionenarten ist verschieden gross; sie ist sehr gross bei NO_3'; nicht viel kleiner bei Cl', Br'; sehr klein bei SO_4'', Azetat, Phosphat.

Jede einzelne dieser Amylase-Komplexverbindungen stellt einen Körper dar, der die Eigenschaften der übrigen Enzyme ganz regulär an sich trägt; er ist als Enzym wirksam nur als Anion, die Wirksamkeit hängt wie sonst von der Azidität ab.

Die relative enzymatische Wirksamkeit dieser verschiedenen Komplexverbindungen auf Stärke ist sehr verschieden. Am stärksten wirkt die Cl'-Verbindung (fast ebenso Br'); viel schwächer die NO_3'-Verbindung und noch sehr viel schwächer die Sulfat-, Azetat-[1]) und Phosphatverbindungen."

„Befindet sich die Amylase in einer Mischlösung von verschiedenen Salzen, unter denen etwas Nitrat ist, so bindet sich die Amylase fast ganz an das Nitrat, zu dem sie die grösste Affinität hat. Da aber Nitrat-Amylase wenig wirksam auf Stärke ist, so hemmen Nitrate die Wirkung der Amylase gegenüber derjenigen Wirkung, wie sie ohne das Nitrat, nur bei Gegenwart der anderen Salze, besonders der Chloride, wäre. Fehlen aber Nitrate in der Salzlösung (wie z. B. im Speichel selbst), so bindet sich die Amylase ganz an das Chlor und es bildet sich die äusserst wirksame Chlor-Amylase, deren Wirkungsoptimum bei pH = 6,7 liegt.



Einwirkungsdauer in Minuten
Fig. 7.

Die besonders starke Wirkung des Chlorions ist besonders durch die eingehende Arbeit von Wohlgemuth[2]) zweifellos festgestellt; dass Br' und J' ähnlich wirken, hatten Neilson und Terry[3]) angegeben. Den Einfluss der Konzentration von BrK und JK hat Fricker[4]) untersucht.

Für 0,058 n. Phosphatlösung und wechselnde NaCl-Mengen (mg in 100 ccm) gibt Ernström (l. c.) die bei pH = 6,5 ermittelte Kurve (Fig. 8, S. 95), welche die Konzentrationsfunktion des Kochsalzes anschaulich macht.

Das Optimum erstreckt sich etwa von 1—1,6 ‰. Es ist bemerkenswert, dass dieses mit dem NaCl-Gehalt des Speichels sehr nahe übereinstimmt.

Um auch dem kolloidchemischen Standpunkt Rechnung zu tragen, sei erwähnt, dass J. T. Groll[5]) die Wirkung der Anionen bei der Verzuckerung durch Ptyalin mit der bekannten Anionenreihe der Kolloidchemie in Verbindung setzt.

---

[1]) Rockwood (Jl Amer. Chem. Soc. 41, 228; 1919) fand auch die Anionen der Weinsäure und der Oxalsäure sehr wenig bzw. nicht wirksam, während nach einer älteren Beobachtung von John (Virch. Arch. 122, 271; 1890) Oxalsäure stark hemmen soll.

[2]) Wohlgemuth, Biochem. Zs 9, 1; 1908. — Siehe auch Kübel, Pflüg. Arch. 76, 276; 1899.

[3]) Neilson und Terry, Amer. Jl Physiol. 22, 43; 1908.

[4]) Fricker, Arch. Verdau. 16, 162 und 369; 1910.

[5]) J. T. Groll, Arch. Néerl. Phys. 2, 516; 1918.

Die zahlreichen Widersprüche in den Angaben über die Phosphatwirkung (Roger, Bang, Löb) beruhen darauf, dass der Einfluss der Anionen nicht scharf vom Aziditätseinfluss unterschieden wurde.

Was die anorganischen Kationen betrifft, so bedürfen die Angaben über die Aktivierung des Speichelenzyms durch Ca˙˙ (Wohlgemuth, Bang[1]) sowie durch Mg˙˙ (Brunacci, Bull. Sc. Med. 80) noch weiterer Bestätigung.

Dass eines der oben genannten Anionen für die Stärkespaltung durch Speichel unbedingt erforderlich ist, geht auch aus der nunmehr oft bestätigten Tatsache hervor, dass die Wirksamkeit von amylasehaltigen Flüssigkeiten oder Extrakten durch Dialyse stark vermindert und schliesslich ganz aufgehoben werden kann.

Organische Aktivatoren: Zahlreiche ältere Angaben über die aktivierende Wirkung von Proteinen und deren Abbauprodukten[2]) dürften darauf zurückzuführen sein, dass diese Stoffe als Puffer die Reaktionslösung der optimalen Azidität nähergebracht und so die Reaktionsgeschwindigkeit vergrössert haben. Asparagin ist mehrfach als besonderer Aktivator bezeichnet worden. In neuerer Zeit hat Rockwood[3]) wieder angegeben, dass α-Aminosäuren, und zwar aliphatische wie aromatische (alle drei Aminobenzoesäuren in gleichem Grade) aktivieren, nicht dagegen Säureamide. Bei Malzamylase ergeben sich Unterschiede, wie Versuche von Sherman und Florence Walker und von U. Olsson (vgl. S. 113 u. ff.) gezeigt haben.

Eine aktivierende Wirkung der Galle fand Wohlgemuth[4]) bei der Speichelamylase, wie bei anderen tierischen und pflanzlichen Amylasen, und zwar auch, wenn er wegen des Kochsalzgehaltes der Galle korrigierte. Wesentlich ist in dieser Arbeit der Nachweis, dass der aktivierende Bestandteil der Galle eine kochbeständige und dialysable Substanz ist.

Die Behauptung von Buglia[5]), dass die aktivierende Wirkung der Galle durch die Natriumsalze der Glykocholsäure und Taurocholsäure bedingt sei, haben Wohlgemuth[6]) und Minami nicht bestätigen können.

Auch im Serum sehr vieler Tiere und in deren Organen fand Wohlgemuth (l. c. 1911) eine kochbeständige dialysable Substanz, welche alle tierischen Amylasen aktiviert. Diese Substanz ist noch unbekannt; sie ist

[1]) Bang, Biochem. Zs 32, 417; 1911.

[2]) Siehe z. B. Roger, Soc. Biol. 64, 16; 1908.

[3]) Rockwood, Jl Amer. Chem. Soc. 39, 2745; 1917. Vgl. aber Wohlgemuth, l. c. 1908.

[4]) Wohlgemuth, Biochem. Zs 21, 432; 1909. — Groll (Ned. Tijdschr. Geneesk. 64; 1920) untersuchte neuerdings die Galle selbst, also die Summe aller Gallenbestandteile und fand eine Aktivierung der Speichelamylase nur bei geringer Gallenkonzentration (0,1 %), während mittlere Konzentrationen keine und Konzentrationen über 5 % eine hemmende Wirkung ausübten (vergl. die Unterschiede gegenüber Pankreasamylase S. 101).

[5]) Buglia, Biochem. Zs 25, 239; 1910.

[6]) Siehe Wohlgemuth, Biochem. Zs 33, 303; 1911.

sicher nicht, wie behauptet worden ist, Lezithin, denn dieses ist nach dem Befund von Lapidus[1]) auf Ptyalin ganz unwirksam.

In diesem Zusammenhang muss auch darauf aufmerksam gemacht werden, dass die Anwendung der Methodik von Wohlgemuth bei Versuchen mit Organextrakten, Seren usw. nicht unbedenklich ist, wie überhaupt der Bestimmung des gebildeten Zuckers mit Fehlingscher Lösung wegen ihrer grösseren Sicherheit in vielen Fällen der Vorzug zu geben ist.

Paralysatoren.

Anorganische Stoffe. Während Cl′, Br′ und J′ beschleunigen, können Fluoride hemmen[2]) (dass Flusssäure dies tut, hatte schon Effront[3]) angegeben). Offenbar hängt ihre Wirkung von den übrigen, in der Lösung vorhandenen Ionen ab.

Schwermetallsalze scheinen auf Ptyalin einen ähnlichen Einfluss auszuüben wie auf Malzamylase (vergl. S. 114). Die ersten Versuche über Hg-Vergiftung verdankt man Hata[4]). Eine von U. Olsson[5]) angestellte Versuchsreihe zeigt, dass auch die Vergiftung des Ptyalins mit $CuSO_4$ eine mit der Zeit fortschreitende Reaktion ist; den zeitlichen Verlauf dieser Vergiftung ersieht man aus Fig. 7. Die Ordinaten bezeichnen Reaktionskonstanten.

Auch Jod vergiftet stark; in einer $1{,}6 \cdot 10^{-5}$ normalen Jodlösung hatte Ptyalin nach 11 Minuten schon 52% seiner Wirksamkeit verloren.

Über den schädlichen Einfluss der Kalziumsalze siehe Pozerski, Soc. Biol. 60; 1906. Kolloide Metalle sind nach Wohlgemuth (l. c. 1908) in verdünnter Lösung ohne Wirkung. Metalle hemmen durch Spuren in Lösung gehender Ionen (Baumgarten; Luger).

Organische Stoffe. Ptyalin ist, wie schon Bd. I, S. 157 erwähnt, gegen 50%igen Alkohol verhältnismässig unempfindlich. Formaldehyd inaktiviert in 0,05 n-Lösung in 1 Stunde um rund 50% (U. Olsson). Dagegen ist Anilin nach dem gleichen Autor ein weniger starkes Gift gegen Ptyalin; die Inaktivierung nimmt mit der Zeit zu (in 1/40 n-Anilinlösung verlor das Enzym nach 70 Minuten 9%, nach 27 Stunden 30% seiner Aktivität).

Kende[6]) gibt an, dass der enzymatische Abbau der Stärke und des Glykogens durch Seifen der höheren Fettsäuren gehemmt wird, gleichgültig, ob man Speichel-, Pankreas- oder Malzamylase verwendet. Es bleibt nachzusehen, ob es sich hier nicht um eine Aziditätsbeeinflussung handelt. Benzylalkohol[7]) fällt Eiweiss und hemmt schon in sehr grosser Verdünnung.

[1]) Lapidus, Biochem. Zs 30, 39; 1911.

[2]) Wohlgemuth, l. c. 1908, S. 18. — Rockwood, Jl Amer. Chem. Soc. 41, 228; 1919. — Kübel (l. c. 1899) sowie Patten und Stiles, Amer. Jl Physiol. 17, 26; 1906 fanden eine Beschleunigung.

[3]) Effront, Bull. Soc. Chim. (3) 4, 627; 1890.

[4]) Hata, Biochem. Zs 17, 156; 1909.

[5]) U. Olsson, H. 117; 1921.

[6]) Kende, Biochem. Zs 82, 9; 1917.

[7]) J. Jacobson, Soc. Biol. 83, 1054; 1920.

Kinetik.

Schon der Umstand, dass es sich beim Stärkeabbau nicht um eine einzige Reaktion handelt, sondern um eine Reihe von Teilreaktionen, erschwert die Deutung der kinetischen Resultate. Dazu kommt noch die Frage, ob und in welchem Grad das Substrat — in der Regel lösliche Stärke — als einheitlicher Stoff betrachtet werden kann. Schliesslich darf — wie schon bei der Besprechung der Methodik betont wurde — nicht übersehen werden, dass an der enzymatischen Reaktion Stärke-Maltose, möglicherweise mehrere Enzyme beteiligt sind. Auch ev. Maltase-Wirkung ist zu berücksichtigen.

Schon 1885 ist es Chittenden und Smith aufgefallen, dass die Bildung des Zuckers aus Stärke nicht glatt zu Ende geht, sondern dass im Verlauf der Reaktion eine Hemmung aufzutreten scheint. Man hat diese Hemmung, welche man auch bei der Wirkung der Pankreas-Amylase und der Malzamylase wiederfindet, der durch die Reaktion gebildeten Maltose zugeschrieben, indem man einerseits an das Auftreten eines Gleichgewichtszustandes zwischen Substrat und Reaktionsprodukten gedacht hat, wie etwa das Gleichgewicht zwischen einem Ester und Alkohol + Säure, oder indem man angenommen hat, dass das Enzym ganz oder zum Teil von der Maltose gebunden wird. Eine solche Bindung ist ja in anderen Fällen bereits nachgewiesen, besonders genau zwischen Saccharase und Rohrzucker (vergl. Bd. I, S. 111ff.).

Mc Guigan[1]), der ebenfalls von einem Gleichgewicht spricht, das eintreten soll, wenn etwa 70% der Stärke verzuckert sind, findet jedoch durch seine eigenen Versuche, dass die Hemmung durch Maltose und Glukose nicht ausreicht, um die Verlangsamung der Reaktion nach Spaltung von 70% Stärke zu erklären; er meint, dass ein anderes, noch unbekanntes Abbauprodukt stärker hemmen muss als Maltose. Das Enzym war beim „Gleichgewicht" noch aktiv.

Im übrigen findet Mc Guigan mit seiner allerdings nicht besonders genauen Methodik[2]), dass in 30 Minuten von der gleichen Speichelmenge prozentisch angenähert gleich viel Stärke verzuckert wird, wenn die Konzentration der löslichen Stärke (Merck) von 2—10% variiert wurde; in verdünnteren Lösungen wurde prozentisch weniger verzuckert. Ferner erzeugt nach seinen Versuchen das gleiche Volumen Speichel in wachsenden Mengen 1%iger Stärkelösung innerhalb gleicher Zeiten die gleiche Menge Zucker.

Einige nach der Jodmethode und der Verzuckerungsmethode (Bertrand) angestellte vergleichende Versuchsreihen von C. L. Evans[3]) sind noch zu

[1]) Mc Guigan, Jl Biol. Chem. 39, 273; 1919.

[2]) Auch in den älteren Arbeiten (Maszewski, H. 31, 58; 1900. — Bielfeld, Zs f. Biol. 41, 360; 1901. — Simon, Jl de Phys. Path. 9, 261; 1907) bleibt der Einfluss der Azidität und der Neutralsalze ganz unberücksichtigt.

[3]) Evans, Jl of Physiol. 44, 191; 1912.

erwähnen; untersucht wurde der Abbau einer 3%igen Stärkelösung bei 46° durch 1 : 10 verdünnten Speichel. Es ergab sich das gewöhnliche Resultat, dass bei kleinen Enzymmengen und erheblichem Substratüberschuss die Anfangsgeschwindigkeit proportional der Enzymmenge E ist.

E	1	2	3	5
% Maltose in 10 Min.	0,077	0,150	0,202	0,385

Bei kleinen Enzymmengen sind also auch die Reaktionskoeffizienten k (berechnet unter Annahme eines Endzustandes nach 75% des theoretisch möglichen Umsatzes) proportional der im gegebenen Volumen enthaltenen Enzymmenge.

Wie überhaupt bei Enzymreaktionen kommt es hier auf die relativen Mengen Enzym und Substrat an (vergl. Bd. I, S. 106); dazu kommt noch

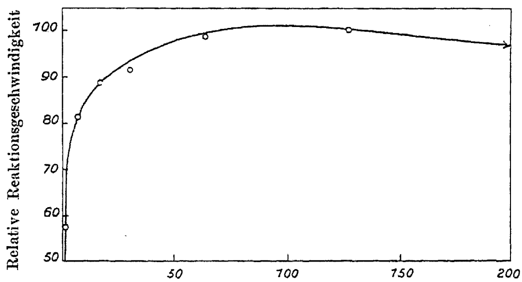


Fig. 8.

speziell bei den Amylasen die Salzkonzentration, deren Einfluss aus der Fig. 8 hervorgeht.

Einfluss der Temperatur.

Was zunächst die Temperatur-Stabilität des Ptyalins selbst betrifft, so ist dieselbe stark von der Azidität abhängig; diese Funktion ist zum ersten Male von E. Ernström[1]) einwandfrei festgestellt worden.

In zugeschmolzenen Röhren wurde die Enzymlösung 60 Minuten lang bei verschiedener Azidität auf 50° gehalten. Nach der Erhitzung wurden die Lösungen zur Stärkeverzuckerung verwendet, welche bei optimalem pH (6,5) in Gegenwart von 100 mg NaCl bei 37° ausgeführt wurde.

Die Fig. 9 zeigt, dass das Ptyalin bei pH = 6,0—6,1 am stabilsten ist, also in etwas saurerer Lösung als der maximalen Wirkung (6,4—6,5) entspricht.

Über die Möglichkeit, Komponenten der Speichelamylase durch fraktionierte Hitze-Inaktivierung zu trennen, geben die früheren Arbeiten keinen sicheren Aufschluss. Nach Bourquelot[2]) kann man einer Amylase durch geeignetes Erhitzen die Fähigkeit zur Endverzuckerung nehmen, während sie

---

[1]) Ernström, H. 118; 1921.

[2]) Bourquelot, C. r. 104, 576; 1887.

gegenüber den ersten Teilreaktionen des Stärkeabbaus ungeschwächt wirksam bleibt. Dies wird aber von Slosse und Limbosch[1]) bestritten; diese konnten keine verschiedenen Temperaturempfindlichkeiten eventueller Amylase-Komponenten feststellen und nehmen deshalb nur eine einzige Speichelamylase an.

Einen ausserordentlich starken Einfluss auf die Stabilität hat der Kochsalzgehalt der Lösung, wie sich aus der Fig. 10 (Ernström) ergibt.

Die in der Abszisse angegebenen mg NaCl beziehen sich auf 11 ccm Lösung (1 ccm Enzymlösung + 5 ccm Phosphatlösung + 5 ccm Wasser); darunter steht die NaCl-Normalität. Optimales pH; 1 Stunde auf 55° erhitzt. Nach Abkühlung 1 ccm dieser Enzymlösung + 50 ccm 2%iger Stärkelösung + 49 ccm Phosphatlösung + 2 g NaCl. 37°. Optim. pH.

Die Stabilität ist in einer ca. 0,1 n-Kochsalzlösung etwa 25 mal so gross wie in der praktisch kochsalzfreien Lösung[2]). Bei weiter steigender NaCl-

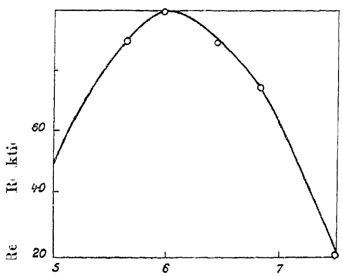


Fig. 9.

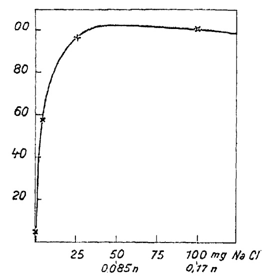


Fig. 10.

Konzentration sinkt dann die Stabilität wieder, wie die folgenden Zahlen Ernströms zeigen:

mg NaCl in 11 ccm-Lösung	NaCl-Normalität	Relat. Reakt. konst.
100	0,17	100
1000	1,7	58,5
2000	3,4	17

Die Kochsalzkonzentration der grössten Stabilität ist also etwa 10 mal so gross wie die Kochsalzkonzentration der grössten Aktivität; dabei ist allerdings zu bedenken, dass der Einfluss auf die Aktivität bei 37°, derjenige auf die Stabilität bei 55° festgestellt ist.

Zu dieser „Schutzwirkung" des Natriumchlorids addiert sich dann noch die Schutzwirkung durch das Substrat und die Spaltprodukte, die bei der Malz-Amylase näher besprochen wird.

Hinsichtlich der Definition und Bestimmung der „Tötungs-Temperatur" sei auf Bd. I, S. 189 verwiesen.

[1]) Slosse und Limbosch, Arch. intern. Physiol. 6, 365; 1908.
[2]) Vgl. hierzu die Angaben von Vernon bezügl. Pankreas-Amylase S. 103.

Ernström fand das Enzym um so temperaturempfindlicher, je verdünnter es war, obwohl Azidität und Kochsalz-Konzentration konstant waren.

Die Angaben Biedermanns[1]) über hohe Temperaturstabilität und Regeneration des Ptyalins sind so auffallend, dass sie noch einer weiteren Prüfung bedürfen.

Reaktionsgeschwindigkeit.

Slosse und Limbosch (l. c.) finden ein offenbar flaches Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen 50° und 58°, während Evans 46° als „optimale Temperatur" bezeichnet. Wie im I. Band dieses Werkes näher auseinandergesetzt wurde, lässt sich eine „Optimaltemperatur" nicht allgemein feststellen. Als Temperaturkoeffizient $k_{t+10} : k_t$ kann für das Temperaturgebiet 10—30° rund 2 angegeben werden, A ist dann etwa 12000. Zwischen 30° und 40° wächst A stark mit der NaCl-Konzentration (Ernström). Von 30° an sinkt der Temperaturkoeffizient stark, möglicherweise zum Teil deswegen, weil sich die Verbindung Ptyalin-NaCl dissoziiert. Bei kleinen NaCl-Mengen fällt der Temperatur-Koeffizient, bzw. A, zwischen 40° und 45° auf 0, dagegen ist A bei optimalem NaCl im gleichen Temperaturgebiet rund 8000; auch zwischen 30° und 40° ändert sich A stark mit dem NaCl-Zusatz (Ernström).

Stärkekörner als Substrat. O. Hammarsten[2]) hat bereits 1871 festgestellt, dass Speichel die rohen Körner der verschiedenen Stärkesorten mit verschiedener Geschwindigkeit angreift.

Stärke	Zucker nach	Stärke	Zucker nach
Kartoffel	2—4 Stunden	Korn	10—15 Minuten
Erbsen	1¾—2 „	Hafer	5— 7 „
Weizen	½—1 Stunde	Roggen	3— 6 „
		Mais	2— 3 „

Diese Unterschiede beruhen in der Hauptsache nicht auf den Amylosen, sondern auf der Verschiedenheit der die Stärkekörner umgebenden Schicht; sie fallen, wie Hammarsten nachwies, fort, wenn die Stärkekörner fein gemahlen oder gekaut werden. Dass also die verschiedenen Stärken durch Amylasen, und zwar sowohl tierische als pflanzliche, annähernd gleich schnell gespalten werden, wird durch eine neue Untersuchung von Sherman, Florence Walker und M. L. Caldwell[3]) bestätigt.

[1]) Biedermann, Fermentforschung 1, 385; 1916 und die folgenden Bände der gleichen Zeitschrift. — Ferner Lowartz, ebenda 3, 241; 1920.

[2]) Hammarsten, Uppsala läkarefören. förhandl. 6, 471; 1871. — Verschiedene Stärken sind später untersucht worden von: Solera, Malys Jb. 1875. — Lea, Jl of Physiol. 11, 234, 1890. — Kübel, Pflüg. Arch. 77, 276; 1898.

[3]) Sherman, Florence Walker und M. L. Caldwell, Jl Amer. Chem. Soc. 41, 1123; 1919.

2. Pankreas-Amylase.

Bouchardat und Sandras entdeckten 1845 die Fähigkeit des Pankreassaftes, Stärke zu verzuckern.

Öfters ist behauptet worden, dass die Pankreasamylase mit der Speichelamylase identisch ist. Indessen lassen sich zwischen beiden Enzymen Unterschiede feststellen, die zwar gering, aber doch deutlich sind [1].

Vorkommen: Unter den untersuchten Pankreas-Säften bzw. Extrakten scheint derjenige des Schweines am meisten Amylase zu enthalten [2]; schwächer wirken Hund [3], Rind [2] und Schaf [1] [2] in einer nicht übereinstimmend festgestellten Ordnung. Auch im Embryo vom Rind ist P.-A. nachgewiesen worden [4]. Kommt nach Zweifel nicht bei neugeborenen Menschen vor. Soll bei Pankreaserkrankungen zuweilen fehlen.

Den Amylasegehalt des Pankreas fand Grützner (1876) zu verschiedenen Zeiten nach aufgenommener Nahrung verschieden gross.

Dass der Pankreas sowohl der Menschen als aller daraufhin untersuchten Tiere hinsichtlich des Amylasegehaltes alle anderen Organe weit übertrifft, geht aus einer Untersuchung von Hirata [5] hervor.

Darstellung: Als Ausgangsmaterial kommt zunächst der Pankreassaft in Betracht, wie man ihn am besten durch permanente Fisteln gewinnt; ferner die frische oder getrocknete Pankreasdrüse, welche mit Wasser bzw. Salzlösung ausgezogen wird (Norris). Vernon [6] extrahiert, wie früher v. Wittich, mit Glyzerin und fällt mit Alkohol.

Die beste Darstellungsmethode verdankt man Sherman und seinen Mitarbeitern. Sherman und Schlesinger [7] fanden das Enzym in 50%igem Alkohol ziemlich stabil. Sie extrahieren 20 g trockenes Pankreaspulver mit 200 ccm 50%igem Alkohol während 5—10 Minuten und filtrieren. Das Filtrat wird mit dem 7fachen Volumen einer Mischung von 1 Teil Alkohol und 4 Teile Äther gefällt. Nach 15 Minuten hat sich ein öliger Niederschlag gebildet, welcher durch Dekantieren von der Lösung getrennt und wieder in möglichst wenig Wasser gelöst wird. Bei Zusatz zu der 5fachen Menge Alkohol fallen nun Flocken aus, die man bei Zimmertemperatur absitzen lässt und dann abfiltriert. Man löst den Rückstand in 200—250 ccm 50%igem Alkohol, der etwa 5 g Maltose enthält. Aus einem Kollodiumsack wird hierauf die Lösung gegen 2000 ccm 50%igem Alkohol dialysiert, welchen man im

[1] Vernon, Jl of Physiol. 28, 156; 1902.

[2] Roberts, Proc. Roy. Soc. 32, 145; 1910. — Floresco, Soc. Biol. 48, 77; 1896.

[3] C. Hamburger, Pflüg. Arch. 60, 545; 1895.

[4] Stauber, Pflüg. Arch. 114, 619; 1906.

[5] Hirata, Biochem. Zs 27, 385; 1910. — L. H. Davis und Ross (1921); Hauptquelle der Blutamylase (siehe S. 108).

[6] Vernon, Jl of Physiol. 29, 302; 1903. Diese Methode führt aber nach Vernon und Sherman-Schlesinger zu einer weitgehenden Schwächung des Enzyms.

[7] Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 33, 1195; 1911 und 34, 1104; 1912.

Verlauf von 40 Stunden noch zweimal erneuert. Schliesslich wird der Inhalt des Kollodiumsacks filtriert und in das gleiche Volumen Alkohol—Äther eingetragen. Auf diese Weise wird ein sehr wirksames Präparat erhalten. Allerdings wird durch diese Methodik — wie Sherman, Garard und La Mer[1]) zeigen — nur etwa 5% von der im Ausgangsmaterial vorhandenen Amylase in gereinigtem Zustand wieder gewonnen. Die Präparate enthalten auch noch eine Proteinase und etwas Maltase.

Eigenschaften der gereinigten Präparate: Die Reinigung der Pankreasamylase ist durch Sherman und seine Mitarbeiter schon so weit getrieben worden, dass es sich bereits lohnt, die chemischen Eigenschaften und die Wirksamkeit der gewonnenen Präparate anzugeben, wenn die Resultate auch durch inaktive Beimengungen noch sehr erheblich entstellt sind.

Die Elementaranalyse[2]) gab:

C 51,9%; H 6,6%; N 15,3%; S 1,0%; P 0,8%.

Folgende Reaktionen fielen positiv aus: Hopkins-Coles Tryptophanreaktion, Xanthoproteinreaktion, Biuretreaktion und Reaktion nach Millon. Die wässerige Lösung koaguliert bei 70°; das Koagulum gibt violette, das Filtrat rosa Biuretreaktion.

Die nähere Untersuchung des Stickstoffs[3]) nach van Slyke ergab an 2 Präparaten:

Stickstoff	Wirks. 3300 n. Sk. = 127 Sf.	Wirks. 2200 n. Sk. = 86 Sf.
NH_3	8,1 %	9,1 %
Melanin	5,3	6,1
Arginin	14,6	14,7
Histidin	6,0	6,9
Lysin	7,4	7,0
Cystin	2,5	2,2
Amino-N des Filtrats	50,4	49,1
Nicht-N des Filtrats	4,6	4,1

Wirksamkeit. Sherman und seine Mitarbeiter geben die Wirksamkeit ihrer Präparate in der von ihnen selbst eingeführten Skala („n. Sk.") an. Ihre besten Pankreaspräparate werden durch die Zahlen charakterisiert:

3600 n. Sk. = 5400 Lintner-Einh.

Dies entspricht in unseren Einheiten **140 Sf.**

Aziditätsbedingungen: Ältere Bestimmungen über den Einfluss von Säuren und Basen sind durch die neuerdings von Sherman, Thomas

[1]) Sherman, Garard und La Mer, Jl Amer. Chem. Soc. 42, 1900; 1920.
[2]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 1104; 1912.
[3]) Sherman und Gettler, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1790; 1913.

und Baldwin[1]) festgestellte Kurve I (Fig. 11) überholt. Dieselbe zeigt ein Maximum bei etwa pH = 7 (genauer 6,8) an.

Salzwirkung: Auch Pankreasamylase ist in Abwesenheit von Salzen inaktiv; sie verliert nach Bierry[2]) durch erschöpfende Dialyse ihre Wirksamkeit völlig.

Der bedeutende Einfluss geringer Neutralsalzmengen ist von Nasse 1875 gefunden, später von Grützner, Vernon[3]), Bierry und Giaja[4]), Preti, Slosse und Limbosch (1908) und neuerdings von Kendall und Sherman[5]) näher untersucht worden. Letztere Forscher erkannten, dass die Aziditätsfunktion und die Neutralsalzfunktion voneinander abhängen. Sie

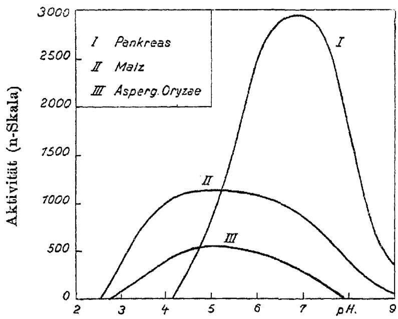


Fig. 11.

geben für eine gegebene Menge von Na_2HPO_4 den Einfluss von NaCl durch eine Kurve an (l. c. S. 1094).

Im übrigen kann man aus den eingehenden Angaben dieser Forscher schliessen, dass sich Pankreasamylase hinsichtlich der Salzwirkung ziemlich analog verhält wie Speichelamylase, so dass also auch hier die Darstellung von Michaelis (S. 90 u. ff.) Gültigkeit hat.

Aktivatoren. Hier haben Kendall und Sherman[5]) besonders festgestellt, dass die früher behauptete Aktivierung durch Asparagin, soweit nicht die Azidität beeinflusst wird, nur sehr gering sein kann.

Monoaminosäuren der Glykokollreihe fand Terroine[6]) stark aktivierend, und zwar spezifisch. Ob die von Pozerski[7]) angegebene Peptonwirkung spezifisch ist, bleibt zu untersuchen.

---

1) Sherman, A. W. Thomas und Baldwin, Jl Amer. Chem. Soc. 41, 231; 1919.
2) Bierry, Biochem. Zs 40, 357; 1912.
3) Vernon, Jl of Physiol. 27, 174; 1901 u. 28, 156, 375; 1902.
4) Bierry und Giaja, Soc. Biol. 60, 479; 1906. — 62, 432; 1907.
5) Kendall und Sherman, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 1087; 1910.
6) Terroine und Weill, Jl de Phys. Path. 14, 437; 1912.
7) Pozerski, Thèse, Paris 1902.

Der von Lapidus behauptete günstige Einfluss von Lipoiden wird von Starkenstein und Minami bestritten.

Die Galle enthält einen kochbeständigen Aktivator für Pankreasamylase[1]. Ob aber gallensaure Salze beschleunigen, wie Buglia[2] und Korentschewsky (1911) angeben, ist nach den negativen Befunden von Wohlgemuth (l. c. 1909) und Minami[3] zweifelhaft.

Paralysatoren. Eine Reihe älterer Untersuchungen liegt vor, besonders über den Einfluss von Alkaloiden; da aber die ältere Methodik keine eindeutigen Resultate liefert, führen wir die Beobachtungen nicht besonders an. Die Ähnlichkeit der Pankreasamylase mit dem Ptyalin lässt vermuten, dass die an letzterem Enzym gewonnenen Resultate (vgl. S. 93) im wesentlichen auch für das Pankreasenzym gültig sind.

Kinetik.

Sowohl die Versuche von V. Henri[4] als die eingehenderen von Ch. Philoche[5] berücksichtigen leider nicht hinreichend den grossen Ein-

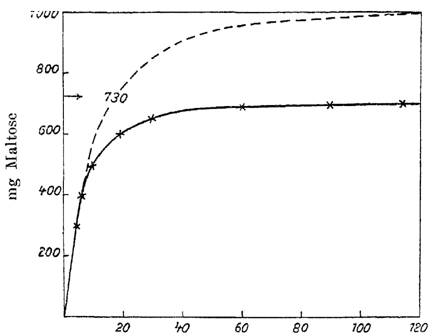


Fig. 12.

fluss der Azidität (und der Neutralsalze); eine neue Bearbeitung der Kinetik dieses Enzyms unter Berücksichtigung der modernen Anschauungen und Methoden wäre dankenswert.

Für den zeitlichen Verlauf der Verzuckerung in Stärkekonzentrationen von 1—3 % ist die Kurve der Fig. 12 charakteristisch. Der immer wiederkehrende „Grenzwert" liegt bei etwa 70—78 % der theoretisch möglichen Maltosemenge. Nimmt man diesen Wert als Endwert, so lassen sich aus

[1]) Wohlgemuth, Biochem. Zs 33, 303; 1911.
[2]) Buglia, Biochem. Zs 25, 239; 1910.
[3]) Minami, Biochem. Zs 39, 339; 1912.
[4]) V. Henri, Thèses, Paris 1903.
[5]) Ch. Philoche, Jl de Chim. Phys. 6, 212 u. 355; 1908.

den Zahlen für a—x Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung berechnen, die einigermassen konstant sind.

Die Reaktionskonstanten sind aber nicht, wie die Theorie fordert, von der Substratkonzentration a unabhängig, sondern sie sind der Substratkonzentration in gewissen Grenzen umgekehrt proportional, so dass dann k.a = konstant ist. Demgemäss sind die Anfangsgeschwindigkeiten bzw. die im Anfang der Reaktion pro Zeiteinheit umgesetzten Mengen von der Stärkekonzentration 4—1 % ziemlich unabhängig und fallen in grösserer Verdünnung zwar etwas, aber viel weniger als die Stärkekonzentration.

Versuch von Kendall und Sherman, l. c. 1910. In 100 ccm-Lösung 0,15 mg Pankreatin, 700 mg NaCl und 10 ccm 0,02 Mol. Dinatriumphosphat. Reaktion 1 Stunde bei 40°.

Konzentration der Stärkelösung in %:	4	2	1	0,5	0,3	0,2	0,1
mg Cu_2O gebildet:	78	76	69	66	60	58	48

Was die Art des Substrates betrifft, so stellte Frl. Philoche an 2%igen Lösungen fest, dass Stärke durch die gleiche Menge Pankreas-Enzym etwa doppelt so schnell verzuckert wird als Glykogen. Da bei Anwendung von Malzamylase das Geschwindigkeitsverhältnis 1 : 20 und in schwachen Enzym-Konzentrationen sogar 1 : 100 ist, so kann man daraus den Schluss ziehen, dass Pankreasamylase an ihr natürliches Substrat Glykogen angepasst ist, sofern der erwähnte Befund nicht durch äussere Faktoren veranlasst ist. Ungekochte Stärke fand die gleiche Verfasserin so reaktionsfähig wie gekochte. Bemerkenswert für die Verwertung der bis jetzt vorliegenden kinetischen Resultate ist eine Untersuchung von Sherman und Schlesinger[1]), in welcher festgestellt wird, dass unter der Einwirkung von Pankreas-Amylase die Menge der umgewandelten Stärke etwa doppelt so gross ist als die Menge der gebildeten Maltose, unabhängig davon, ob ein (weniger wirksames) Handelspankreatin oder ein hochaktives Präparat angewandt wurde.

„Amyloklastische Kraft“	„Zuckerbildende Kraft“
760	380
16000	8940

Im Gegensatz hierzu erwies sich bei Anwendung von Malzamylase 66—90% der verwandelten Stärke verzuckert.

In diesem Zusammenhang sei auch noch erwähnt, dass sowohl für den zeitlichen Verlauf der Stärkespaltung wie für den Einfluss der Enzym- und Substratkonzentrationen zahlreiche Formeln aufgestellt worden sind (V. Henri, Philoche, Kendall und Sherman). Ein Hinweis auf die erwähnten Arbeiten muss genügen, da eine nähere Einsicht in den Vorgang der enzymatischen Verzuckerung durch diese Formeln nicht gewonnen worden ist.

[1]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1784; 1913. — Siehe auch die bemerkenswerte Arbeit von Kendall und Sherman, l. c. 1910.

Der Arbeit von Sherman, Thomas und Baldwin entnehme ich folgende Zahlen über den Einfluss der NaCl-Konzentration; sie gilt für 40° und eine Na_2HPO_4-Konz. = 0,001 Mol. per Liter.

NaCl Mol. per Liter	Wirksamkeit (neue Skala)
0,0001	450
0,01	2690
0,02	2715
0,03	2750
0,05	2900
0,06	2875
0,07	2830
0,085	2835
0;10	2830

Das Maximum würde hiernach etwa bei der Normalität 0,05 liegen, entschieden höher als bei der Speichelamylase nach Ernström. Hierzu ist noch zu erwähnen, dass nach einem Befund von A. Gross[1]) das NaCl-Optimum bezüglich des Stärkeabbaus (gemessen durch Jodreaktion) und der Verzuckerung das gleiche ist, während in dieser Hinsicht bei Taka-Amylase Verschiedenheiten bestehen.

Temperatur.

Hier liegen keine exakten Daten über die maximale Enzym-Stabilität der substratfreien Amylase vor. Es geht aus den älteren Versuchen von Roberts (1881) und den neueren von Vernon[2]) schon hervor, dass die Stabilität in kochsalzfreier Lösung viel geringer ist, als in Gegenwart dieses Elektrolyten. Dies wird durch eingehendere Versuche von Sherman und Schlesinger[3]) bestätigt. Pankreasamylase ist in wässeriger Lösung schon bei 5—10° bedeutend weniger stabil als Malz-Amylase (dies gilt natürlich für den bis jetzt erreichten Reinheitsgrad). Quantitative Angaben findet man in Shermans Tabelle S. 1307; dort wird auch auf die grosse Labilität dialysierter Amylaselösungen eingegangen.

Was die Reaktionsgeschwindigkeit der Pankreas-Amylase bei verschiedenen Temperaturen betrifft, so müssen hier in Ermangelung von anderen Angaben die „Optimum-Temperaturen" erwähnt werden. Nach Vernon liegt sie in salzarmer Lösung bei 35°. In Anwesenheit von 0,2 % NaCl fand er die maximale Wirkung bei 50°; die Wirksamkeit hörte auf zwischen 65 und 70°. Nach Kendall und Sherman ist der Temperaturkoeffizient der salzarmen Lösung bereits zwischen 21° und 40° negativ, während er bei Gegenwart von Salz normal ist. Die Autoren geben folgende Zahlen an:

[1]) Siehe Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1784; 1913.
[2]) Vernon, Jl of Physiol. 27, 190; 1901.
[3]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 1305; 1915.

In 100 ccm-Lösung 10 ccm 0,02 Mol. Dinatriumphosphat und 700 mg NaCl; 0,5 mg Enzympräparat wirken während 1 Stunde bei folgenden Temperaturen:

Temperatur:	21	30	40	45	50	55	60	65
mg Cu_2O:	65	122	238	298	345	378	256	66

Der Temperaturkoeffizient zwischen 20° und 40° ist der schon von Vernon festgestellte und auch für andere Amylasen öfters gefundene, wonach eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit für eine Temperatursteigerung von 10° eintritt. Über 40° sinkt der Temperaturkoeffizient bis etwa 55°, wo das „Optimum" gefunden wird. Vermutlich liegen die Temperaturverhältnisse ähnlich wie bei der Speichelamylase, wo sie exakter untersucht worden sind.

Sherman und Schlesinger (1915) geben an, dass in der ca. 1%igen Lösung ihres gereinigten Pankreas-Präparates Nr. 60 (300 mg in 30 ccm Wasser) zwischen 50° und 55° Koagulation eintrat; das Koagulum betrug 11,6% des ursprünglichen Trockengewichts und enthielt 16,9% N, während im nicht-koagulierten Anteil 14,9% N gefunden wurden.

Zymogen der Pankreas-Amylase. Die inaktive Ausgangsform des Enzyms, welche man Zymogen nennt (ohne es irgendwie charakterisieren zu können), ist bei der Pankreas-Amylase nicht mit Sicherheit bekannt. Nach Lintwarew[1]) kommt Pankreas-Amylase nur in aktiver Form vor. Vernon[2]) nimmt ein unlösliches Prozymogen an — analog dem Prozymogen des Trypsins —, welches direkt in das lösliche aktive Enzym übergehen soll.

3. Darm-Amylase.

Wenn auch nunmehr feststeht, dass der Dünndarm seine eigene Amylase besitzt (Röhmann[3]), Grünert[4]) Brown und Heron[5]), Tebb[6])), so ist doch die Menge der Amylase im Fistelsaft nur gering[7]). Nach Röhmann ist Amylase im Jejunum reichlicher vertreten als im Ileum; Brown und Heron fanden beim Schwein beide Teile gleich wirksam, das Duodenum verhältnismässig wenig; sie schreiben die Enzymabsonderung den Peyerschen Drüsen zu. Nach Grützner (Pflüg. Arch. 16; 1877) enthalten die Brunnerschen Drüsen keine Amylase. Im Dickdarmsekret des Hundes fanden Wakabayashi und Wohlgemuth sehr wenig Amylase.

Jedenfalls ist die Schleimhaut selbst viel wirksamer als der Darmsaft.

Ambard und Binet[8]) finden, dass der Amylasegehalt des Hundedarms sich mit der Ernährung nicht ändert.

[1]) Lintwarew, Biochem. Zbl. 1, 201; 1903.
[2]) Vernon, Jl of Physiol. 28, 137; 1902.
[3]) Röhmann, Pflüg. Arch. 41, 424; 1887.
[4]) Grünert, Zentralbl. f. Physiol. 5, 285; 1892.
[5]) Brown und Heron, Lieb. Ann. 204, 228; 1880.
[6]) Tebb, Jl of Physiol. 15, 42; 1893.
[7]) Mendel, Pflüg. Arch. 63, 425; 1896 („paralytischer Darmsaft"). — Nagano, Mitt. Grenzgeb. Med. Chir. 9, 393; 1902 (menschl. Fistelsaft). — Pregl, Pflüg. Arch. 61, 288; 1895 (Fistelsaft des Schafes). — Bierry und Frouin, C. r. 142; 1565; 1906.
[8]) Ambard und Binet, Soc. Biol. 65, 259; 1908.

Amylasen im Verdauungstraktus niedrigerer Tiere.

Der Magensaft des Flusskrebses (Potamobius astacus L.) ist in neuerer Zeit eingehend von Lowartz untersucht worden. Auch dieses Enzym wird durch NaCl aktiviert. Ein „Temperaturoptimum" wird zwischen 43° und 46° angegeben; Erwärmung auf 95° (Zeit?) soll noch keine vollständige Hemmung bewirken, und gekochter Magensaft soll lösliche Stärke „abbauen" (beurteilt nach der Jodreaktion); dabei soll es sich um eine „Regeneration" des aus der löslichen Stärke unter Mitwirkung des inaktivierten Enzyms im Sinne von Biedermann handeln.

Diese Arbeit, wie auch diejenigen von Biedermann, zeigen, wie wünschenswert es ist, dass bei solchen Untersuchungen wenigstens die Grundbegriffe der chemischen Dynamik berücksichtigt werden. Im Sekret der Mitteldarmdrüse des Flusskrebses sind übrigens schon früher zahlreiche Enzyme nachgewiesen worden; Hoppe-Seyler[1]) fand unter diesen auch Amylase. Unter anderen Wirbellosen hat man besonders Würmer (Frédéricq, Krukenberg) und Gastropoden, am meisten Helix pomatia[2]) hinsichtlich des Amylasegehaltes studiert. Bei allen Mollusken scheint die Mitteldarmdrüse, auch Hepatopankreas oder zuweilen Leber genannt, verhältnismässig reich an Amylase zu sein.

4. Leber-Amylase.

Die stärkespaltende Fähigkeit der Leber des Menschen und höherer Tiere ist durch v. Wittich[3]) und Claude Bernard[4]) entdeckt worden. Eves (1884) erzielte bereits mit einem alkoholbehandelten Präparat aus Schafleber Stärkespaltung. Den Nachweis eines wirklichen diastatischen Enzyms in der Leber, dessen Existenz eine Zeitlang in Abrede gestellt wurde, verdankt man Pavy[5]), Tebb[6]), Pick[7]) und Dastre[8]).

Vorkommen. Die Leber ist nach Wohlgemuth ein verhältnismässig amylasearmes Organ ($D_{24}^{38^\circ} = 10—200$ in Wohlgemuths Einheit). Nach Macleod[9]) ist der Hund am reichsten an Leberamylase, dann folgen Schwein, Kaninchen[10]) und Lamm. In der Rattenleber[11]) beträgt der Amylasegehalt in der Wohlgemuthschen Einheit gemessen $D_{24}^{38^\circ} = 156—250$. Der Enzymgehalt in Seiten- und Mittellappen der Froschleber[12]) ist annähernd gleich.
In der embryonalen Leber fanden Mendel und Saiki[13]) nur wenig Amylase.

Sehr wichtig ist für die Beurteilung der Rolle der Leberamylase die Frage, ob Glykogen und Amylase in der Leberzelle räumlich getrennt sind. Diese Frage ist neuerdings von Kerner und Lesser[12]) wieder aufgenommen

---

1) Hoppe-Seyler, Pflüg. Arch. 14, 394; 1877.
2) Biedermann und Moritz, Pflüg. Arch. 75, 1; 1899. — 73, 247; 1898.
3) v. Wittich, Pflüg. Arch. 7, 28; 1873.
4) Claude Bernard, C. r. 85, 519, 1877.
5) Pavy, Jl of Physiol. 22, 391; 1898.
6) Tebb, Jl of Physiol. 22, 423; 1898.
7) Pick, Hof. Beitr. 3, 63; 1902.
8) Dastre, Soc. Biol. 53, 32; 1902.
9) Macleod und Pearce, Amer. Jl of Physiol. 27, 341; 1916.
10) Die Schwankungen von dem Mittelwert fand Starkenstein (1910) recht gross, im Gegensatz zu Wohlgemuth $D_{24}^{38^\circ} = 5-12{,}5$).
11) Shigenobu Kuriyama, Jl Biol. Chem. 33, 193; 1918.
12) Kerner und Lesser, Biochem. Zs 102, 284; 1920. — Lesser, ebenda 294 und 304.
13) Mendel und Saiki, Amer. Jl of Physiol. 21, 64; 1908.

worden, und zwar mit dem Resultat, dass die Amylase aus der Leber des Frosches mit Ringerlösung herausgespült werden kann. Adrenalin soll nach Lesser die räumliche Trennung von Glykogen und Amylase in der Leber aufheben.

Da die Amylase offenbar für den Zuckerhaushalt im Tierkörper eine entscheidende Rolle spielt, so hat sie beim Studium der Störungen des Zuckerumsatzes, in erster Linie bei Diabetes, schon oft Beachtung gefunden, wenn auch eine abschliessende Untersuchung über dieses wichtige Kapitel noch fehlt.

Bainbridge und Beddard[1]) haben auch bei Diabetikern Amylase in der Leber nachweisen können. Schlesinger[2]) fand bei Diabetes keine Abweichung vom normalen Amylasegehalt.

Die Angabe Bangs, dass unmittelbar nach dem Zuckerstich beim Kaninchen der Amylasegehalt steigt, ein Maximum erreicht und dann wieder zurückgeht, konnte Starkenstein nicht bestätigen.

Das Resultat von Zegla[3]), dass bei pankreasdiabetischen Katzen die Leberamylase vermindert ist, bedarf vielleicht noch einer Nachprüfung, ebenso der Befund des gleichen Autors, dass bei Phlorizin-Diabetes der Kaninchen eine Vermehrung der Leberamylase eintritt[4]).

Bei Adrenalinglukosurie sind noch keine bestimmten Resultate bezüglich Amylase erhalten worden, offenbar sind ev. Effekte sehr schwach.

Darstellung. Ausgangsmaterial ist hier nicht das Sekret, sondern das entblutete Gewebe des Organs. v. Wittich extrahierte getrocknete Leber mit Glyzerin, Seegen und Kratschmer benutzten frische Leber, Pavy (l. c.) verrieb fein verteiltes frisches Lebergewebe von Kaninchen mit viel absolutem Alkohol und liess die Masse 6 Monate stehen. Dann wurde sie mit Äther gewaschen, getrocknet und gepulvert. Dieses Pulver, in 1%iger Kochsalzlösung aufgeschlemmt, erwies sich nach 4 Stunden bei 46° deutlich diastatisch wirksam.

Tebb extrahierte das Enzym aus getrockneter Leber mittels 5%iger Natriumsulfatlösung und entfernte das Salz durch Dialyse. Pick behandelte das fein verteilte frische Lebergewebe mit Alkohol und nahm die Extraktion des Pulvers mit physiologischer Kochsalzlösung vor.

Wohlgemuth (1909) und Zegla arbeiteten mit Presssaft, der nach Verreiben mit Quarzsand durch Auspressen bei 100—200 Atm. gewonnen war. Bang benutzte eine Aufschwemmung von frischem Leberbrei in physiologischer Kochsalzlösung. Hierzu hebt Starkenstein (l. c.) mit Recht hervor, dass das Arbeiten mit frischen tierischen Organen für quantitative Vergleiche des Amylasegehaltes von Organen ungeeignet ist.

---

[1]) Bainbridge und Beddard, Biochem. Jl 2, 89; 1907.

[2]) Schlesinger, Deutsche med. Wochenschr. 34, 593; 1908. — Siehe auch Bang, Hofm. Beitr. 10, 320; 1907.

[3]) Zegla, Biochem. Zs 16, 111; 1909.

[4]) Siehe hierzu Wohlgemuth und Benzur, Biochem. Zs 21, 460; 1909.

Empfehlenswert für viele Untersuchungen ist offenbar die Herstellung eines Organpulvers nach der Methode von Wiechowski (vgl. Bd. I, S. 7), die darin besteht, dass man den Leberbrei in dünner Schicht auf Glasplatten im Luftstrom schnell trocknet.

Aziditätsbedingungen sind für die Leberamylase nicht besonders geprüft worden; indessen hat man allen Grund anzunehmen, dass die verschiedenen Organamylasen in dieser Hinsicht übereinstimmen.

Was die Neutralsalzwirkung betrifft, so hat Starkenstein die Leberamylase durch Dialyse vollständig inaktivieren können, und hat auch versucht, eine Konzentrationsfunktion des Kochsalzes zu ermitteln; allerdings eignet sich hierzu die Jodmethode wenig.

Auch bezüglich des Temperatur-Einflusses kann wohl auf die Speichel- und Pankreasamylase verwiesen werden; nur ein Befund von Pavy verdient eigens Erwähnung, dass die diastatische Wirkung des Leberpulvers durch Kochen mit absolutem Alkohol nicht aufgehoben wird.

5. Muskeln

enthalten ebenfalls stets Amylase, und zwar wie Mendel und Saiki[1]) bei einer Untersuchung am Schwein fanden, bereits vom Embryonalzustand an, während sonstige Organe verschiedener Tiere gewöhnlich mit zunehmender Entwickelung reicher an Enzym werden (Pugliese u. a.).

Nach Nasse u. a. geht ein solches Enzym in den Muskelsaft über, wodurch eine ältere Untersuchung Halliburtons[2]) bestätigt wird.

Die diastatische Wirkung der Muskeln bei Diabetes mellitus ist von Bainbridge und Beddard[4]) untersucht worden.

6. Niere, Herz[5]) und andere Organe.

Den relativen Amylasegehalt der Organe bei verschiedenen Tieren haben Wohlgemuth und Benzur[6]) (Kaninchen) sowie Hirata[7]) gemessen.

Wohlgemuth und Benzur (l. c.) fanden, dass die diastatische Wirkung der Niere bei Phlorizinvergiftung und bei Adrenalinglukosurie steigt[8]), während bei der Leber und im Muskel keine diesbezügliche Veränderung eintrat.

Nach Kisch[3]) ist besonders der Herzmuskel reich an Amylase. Die Wirkung des Muskelpresssaftes hat schon Wohlgemuth studiert.

---

[1]) Mendel und Saiki, Amer. Jl Physiol. 21, 64; 1908.
[2]) Halliburton, Jl Physiol. 8, 182; 1887.
[3]) Kisch, Hofm. Beitr. 8, 210; 1906.
[4]) Bainbridge und Beddard, Biochem. Jl 2, 89; 1907.
[5]) Berblinger, Zieglers Beitr. pathol. Anat. 53, 155; 1912.
[6]) Wohlgemuth und Benzur, Biochem. Zs 21, 460; 1909.
[7]) Hirata, Biochem. Zs 27, 385; 1910.
[8]) Siehe auch Pavy, Brodie und Siau, Jl of Physiol. 29, 407; 1903.

Nach Tschernoruzki[1]) soll durch intravenöse Injektion von Nukleinsäure (Hefenukleinat Merck) die enzymatische Wirkung der Organe erhöht werden, und zwar die diastatische am meisten. „Im Gehirn waren die Werte für die Amylase 400 mal, in den Lungen 250 mal höher."

In der Schilddrüse und im Hoden verschiedener Tiere fanden E. Fischer und Niebel[2]) Amylase, in den Nebennieren Croftan[3]).

Kito[4]) schliesst aus seinen Versuchen an Meerschweinchen, dass die Plazenta für Amylase durchlässig ist (vergl. auch Teil I, S. 91).

7. Blut.

Das von Claude Bernard nachgewiesene Vorkommen der Amylase im Blutserum wurde durch Bial, Pick, Ascoli und Bonfanti[5]) näher studiert. Menschenblut ist verhältnismässig arm an Amylase, auch schwankt der Enzymgehalt offenbar stark. Bedeutend grössere Mengen hat Wohlgemuth (l. c.) bei Meerschweinchen und Hunden gefunden.

Eingehende Untersuchungen über physiologische Einflüsse verdankt man auch Macleod und Pearce[6]).

Nach Schlesinger[7]) wird die Amylase bei höheren Tieren im Pankreas gebildet und durch das Blut auf die übrigen Teile des Körpers verteilt; indessen kommen für die Amylasebildung auch noch andere Organe, besonders die Leber, in Betracht[8]). Wahrscheinlich ist, dass die im Blut zirkulierende Amylase sich auf dem Weg zu den Nieren befindet, wo sie ausgeschieden wird (Carlson und Luckhardt[9]), King[10])).

A. J. Carlson und seine Mitarbeiter[11]) haben die Beziehung des Amylasegehaltes des Speichels und des Blutes genau verfolgt.

Der Amylasegehalt des Kaninchenserums (62,5 nach Wohlgemuths Skala) wird durch Schilddrüsenaufnahme nicht geändert[12]).

Bei Meerschweinchen fand Schirokauer (1910) den Amylasegehalt des Blutes während der Gravidität abnorm hoch.

Was pathologische Bedingungen betrifft, so machen sich auch hier die erwähnten grossen Schwankungen geltend. So fanden Myers und Kilian[13])

Tschernoruzki, Biochem. Zs 36, 363; 1911.
E. Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. d. Wiss. S. 75, 73; 1896.
Croftan, Pflügers Arch. 90, 285; 1902
Kito, Amer. Jl Physiol. 48, 481; 1919.
Ascoli und Bonfanti, H. 43, 156; 1904.
Macleod und Pearce, Amer. Jl Physiol. 25—29; 1910—12.
Schlesinger, Deutsche med. Wochenschr. 34, 593; 1908.
Gould und Carlson, Amer. Jl Physiol. 29, 165; 1911.
9) Carlson und Luckhardt, Amer. Jl Physiol. 23, 148; 1908.
10) King, Amer. Jl Physiol. 35, 301; 1914.
11) A. J. Carlson und Mitarbeiter, Amer. Jl of Physiol. 1907—1909.
12) Kuriyama, Jl Biol. Chem. 33, 193; 1918.
13) Myers und Kilian, Jl Biol. Chem. 29, 179; 1917.

bei zahlreichen Fällen von Nephritis den Amylasegehalt des Blutes auf das doppelte bis dreifache des normalen gesteigert, dagegen konnten Lewis und Mason[1]) zwar Erniedrigungen in der Amylasewirkung feststellen, aber keinen Zusammenhang mit der Art der Nierenerkrankung.

Besonders naheliegend war es, bei Diabetes mellitus Beziehungen zwischen der Höhe des Blutzuckergehaltes und der diastatischen Aktivität zu suchen (Foster 1867). Während Myers und Kilian (l. c.) bei 13 Diabetesfällen eine Amylasewirkung fanden, welche die normale um das 2—5 fache übertrifft[2]) und nach ihren Ergebnissen eine Beziehung zur Menge des Blutzuckers annehmen, liefern die Ergebnisse von Bang und die neueren von Lewis und Mason keinerlei Anhaltspunkte dafür.

Auch konnte Wohlgemuth keine Veränderung bei Adrenalin- und Phlorizindiabetes nachweisen.

Ungeändert bleibt nach Schirokauer und Wilenko[3]) die Blut- und Leberamylase auch im Fieber.

8. Serum, Lymphe, Milch, Zerebrospinalflüssigkeit.

Diese Flüssigkeiten sind besonders von Röhmann und Bial[4]), sowie Carlson und Luckardt (l. c.) untersucht worden, Zerebrospinalflüssigkeit wurde von Panzer[5]), Milch von Wohlgemuth[6]) untersucht. Nach Sato[7]) soll durch 100 ccm Kuhmilch bei 40° in 30 Min. 5—21 mg Stärke, in 24 Stunden 10—37 mg Stärke gespalten werden.

Eine Amylase findet sich nach Roger (Soc. Biol. 64) auch im Hühnerei und soll teilweise in Äther löslich sein (?).

9. Harn.

Menschlicher Harn soll eine ziemlich gleichmässige Amylasewirkung zeigen[8]). Lindemann[9]) fand die Wirksamkeit in der Wohlgemuthschen Einheit D = 15—45. Männer scheiden nach Wohlgemuth[10]) mehr Amylase aus als Frauen.

Wesentlich beeinflusst wird der Amylasegehalt des Harns von der Durchlässigkeit der Nieren[11]). Hirata[12]) fand bei experimenteller, durch

---

[1]) Lewis und Mason, Jl Biol. Chem. 44, 455; 1920.
Lépine und Barral hatten 1891 eine Verminderung der Amylase gefunden.
[3]) Schirokauer und Wilenko, Zs klin. Med. 70, 257; 1910.
[4]) Röhmann und Bial, Pflüg. Arch. 52—55.
[5]) Panzer, Wiener klin. Wochenschr. 12, 805; 1899.
[6]) Wohlgemuth und Strich, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. 25, 520; 1910.
[7]) Sato, Biochem. Jl 14, 120; 1920.
[8]) Pariset, Soc. Biol. 63, 614; 1907.
[9]) Lindemann, Zs klin. Med. 75, 58; 1912.
[10]) Wohlgemuth, Zs Urologie 5, 801; 1911.
[11]) Rosenthal, Deutsche med. Wochenschr. 37, 923; 1911.
[12]) Hirata, Biochem. Zs 28, 23; 1910.

Sublimat-, Chrom- und Uranvergiftung an Kaninchen hervorgerufener Nephritis eine Abnahme der Amylase im Urin. Man könnte hier an eine Inaktivierung des Enzyms durch die in den Harn übergetretenen Gifte denken, indessen wurde gleichzeitig eine Zunahme der Amylase im Blut konstatiert. Beziehungen zur Nephritis besprechen auch Wynhausen[1]) und v. Benczúr (1910).

Bei Diabetes ist nach übereinstimmendem Befund zahlreicher Beobachter die Amylasewirkung des Harns stark herabgesetzt (Lépine, Wohlgemuth, Rosenthal (l. c.), Marino[2]) u. a.). Indessen ist hier aber immer in Betracht zu ziehen — besonders bei Diabetes insipidus —, dass der Nachweis der Harnenzyme im krankhaft vermehrten Harn durch die grosse Verdünnung wesentlich erschwert wird (Schaumberg; Wolpe[3])).

Tierische Anti-Amylasen.

Angaben über die Immunisierung von Kaninchen gegen Pankreasamylase findet man bei Ascoli und Bonfanti (H. 43).

B. Pflanzliche Amylasen.

Die Gegenwart eines stärkeverzuckernden Enzyms im Malz wurde 1833 von Payen und Persoz und bald darauf von Saussure entdeckt. Die Verzuckerung der Stärke durch Malz hatten bereits 1785 Irvine und 1815 Kirchhoff beschrieben.

1. Amylasen der Phanerogamen.

Vorkommen: Vor allem sind hier die Samen der Gräser zu nennen, in erster Linie der Gerste, welche als Malz bekanntlich die Amylase zu den technisch wichtigen Verzuckerungen liefert, ferner von Roggen, Weizen, Hafer, Mais, Hirse, Reis (Chrzaczsz, Zs Spir.-Ind. 32, 1909). Besonders gross ist die Wirkung der keimenden Samen.

Die Bildung der Amylase in dem Samen hängt mit dem Keimprozess offenbar aufs engste zusammen. Nach Brown und Morris u. a. wird das Enzym durch den Embryo in das ihm benachbarte Endosperm ausgeschieden.

„Wenn man die Entwickelung des Embryo in dem keimenden Samen mit Hilfe des Mikroskops verfolgt" — schreibt Green, einer der besten Kenner dieses Gebietes — „so kann man zu einer Zeit, zu der das primäre Würzelchen eine Länge von etwa 2 mm erreicht hat, Veränderungen in den stärkeführenden Zellen des Endosperms beobachten." Dieses aus dem sog. Scutellum des Embryos sezernierte Enzym bezeichnet Green nach dem Vorgang von Brown und Morris[4]) als Sekretionsdiastase im Gegensatz zur Translokationsdiastase des Endosperms und aller vegetativen Organe.

---

[1]) Wynhausen, Berliner klin. Wochenschr. 47, 2107; 1910.

[2]) Marino, Deutsches Arch. klin. Med. 103, 325; 1911.

[3]) Wolpe, Berliner klin. Wochenschr. 58, 101; 1921. Daselbst Literatur.

[4]) Brown und Morris, Jl Chem. Soc. 57, 505; 1890.

Es scheint nicht, dass sich die eben erwähnte Zweiteilung der Amylasen aufrecht erhalten lässt. Indessen kann auf diese in das botanische Gebiet übergreifenden Fragen hier nicht näher eingegangen werden, vielmehr sei auf die bekannte „Biochemie der Pflanzen“ von Czapek (2. Aufl. Jena 1920) Bd. 1, I. Teil, Abschn. 1—4 verwiesen.

Ausser in den genannten Samen findet sich Amylase aber auch in Pollenkörnern (Green), Knollen (z. B. Kartoffelknollen), Wurzeln, Rüben, Blättern, Rinden, überhaupt wohl in allen pflanzlichen Organen und Säften, welche Stärke enthalten und in welchen ein Stärke-Umsatz stattfindet. Es würde deswegen zu weit führen, hier alle Befunde über Vorkommen zu zitieren, und es sei deswegen auf das Werk von Czapek, 2. Aufl., Bd. 1 verwiesen. Eine interessante Studie über die Jahres-Variationen der Amylasewirkung in grünen Blättern hat K. Sjöberg (1921) verfasst.

Darstellung: Unter den zahlreichen Arbeiten, in welchen auch die Darstellung der Amylase erwähnt wird und die man bei Sherman[1]) ziemlich vollständig zitiert findet, können hier nur einige wesentliche Methoden angeführt werden.

Lintner[2]) extrahierte 1 Tl. Gerstengrünmalz 24 Std. mit 2—4 Tln. 20%igen Alkohols und fällte den Extrakt mit dem 2—2,5 fachen Volumen abs. Äthers. Der sich rasch absetzende Niederschlag wird durch Dekantieren von der Flüssigkeit getrennt und mit absolutem Alkohol verrieben, nach Filtration mit abs. Alkohol gewaschen, mit Äther zerrieben, abgesogen und im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet. Das so erhaltene gelblich-weisse Pulver hält stets noch geringe Mengen von Alkohol zurück. Ausserdem enthielt das Rohpräparat 16% Asche, hauptsächlich Calciumphosphat. Durch wiederholtes Umfällen und Dialysieren wurde eine gewisse Reinigung, besonders eine Verminderung des Aschengehaltes bis auf 5% erzielt. — Später hat Lintner auch eine Darstellung aus Weizenmalz beschrieben; ähnliche Methoden hat Wróblewski[3]) angewandt.

Osborne und Campbell[4]), deren Angaben sich durch Genauigkeit auszeichnen, benutzten die Ausfällung durch Ammoniumsulfat zur Darstellung der Amylase.

Sherman[5]) ist mit seinen Mitarbeitern hinsichtlich der Reinigung der Amylase am weitesten gekommen. Er stellt sein Rohpräparat folgendermassen dar: Gemahlenes Malz wird etwa 2 Stunden mit der 2,5 fachen Menge Wassers, verdünnten Alkohols oder sehr verdünnter Phosphorsäure bei ca. 10° extrahiert. Der filtrierte Extrakt wird 1—2 Tage durch Kollodiumsäcke gegen kaltes Wasser dialysiert und hierauf mit Alkohol oder Azeton ausgefällt bis die Alkohol-Konzentration etwa 70% erreicht.

[1]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1617; 1913.
[2]) Lintner, Jl prakt. Chem. N.F. 34, 386; 1886.
[3]) Wróblewski, H. 24, 173 und Chem. Ber. 30, 2289; 1897.
[4]) Osborne und Campbell, Jl Amer. Chem. Soc. 18, 536; 1896.
[5]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1617; 1913.

In der Regel wurde durch diese Methodik ein Präparat erhalten, dessen Wirksamkeit grösser ist als 400 der Shermanschen Skala (= 600 Lintner-Einheiten = 15 Sf. unserer Zählung). Das beste Fünftel der Präparate zeigte 1200—1540 Sherman-Einheiten (= ca. 53 Sf.). An diesen ergab die Stickstoffbestimmung[1]) nach van Slyke:

Stickstoff		Wirksamkeit in Sf.	
		13	34
		D	E
NH_3	7,8	7,3	7,9
Melanin	4,1	3,9	5,6
Arginin	14,5	13,1	14,2
Histidin	4,6	6,5	5,4
Lysin	7,5	6,7	5,5
Cystin	4,0	4,0	4,9
Amino-N des Filtrats	55,3	53,9	52,4
Nicht-N des Filtrats	3,5	4,3	4,5

Bei weiteren Reinigungsversuchen von Sherman und Schlesinger[2]) wurde der im Vakuum eingeengte Malzextrakt zuerst ausgiebig dialysiert und dann mit Ammoniumsulfat gesättigt, wodurch eine inaktive Fällung entsteht. Die Lösung wurde wieder dialysiert, von einem Niederschlag abdekantiert und unterhalb 15^0 mit reinem kalten Alkohol versetzt, bis dessen Gehalt 50 bzw. 65 % betrug. Durch dieses Verfahren wurde zwar eine höhere mittlere Wirksamkeit der Präparate erzielt, dagegen stieg die maximale Wirksamkeit nicht über 1570 Sherman-Einheiten = 60 Sf. Diese aktivsten Präparate enthielten 15,3 % N.

Sherman und Schlesinger haben ihre hochaktiven Malz-Amylasen eingehend mit ihren Pankreas-Amylase-Präparaten verglichen[3]). Sie kommen dabei zu folgenden Ergebnissen:

Beide Amylasen sind amorphe, stickstoffhaltige Substanzen, löslich in Wasser und in 50%igem Alkohol, unlöslich in konz. Alkohol oder Azeton. Beide zeigen die typischen Protein- (Millon-, Xantoprotein-, Tryptophan- und Biuret-)Reaktionen. Beide enthalten 15—16 % N. Untersuchung nach van Slyke siehe S. 99. Beim Erhitzen geben beide ein koaguliertes Albumin und eine Proteose oder ein Pepton.

Aziditätsbedingungen: In einer vorläufigen Mitteilung haben Verf. und Svanberg[4]) eine Aziditätskurve für Malzamylase angegeben (Fig. 13). Die kleinen Vierecke sind die Dissoziationsreste, welche sich aus einer Dissoziationskonstante von $10^{-7,75}$ ergeben (siehe die folgende Tabelle). In der

[1]) Sherman und Gettler, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1790; 1913.
[2]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 643; 1915.
[3]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 1305; 1915.
[4]) Euler und Svanberg, H. 112, 193; 1920.

Fig. 14 ist die Dissoziationsrestkurve gezeichnet und die experimentellen Punkte sind markiert.

Relative Dissoziationsreste einer Säure von $K = 10^{-7,75}$.

pH	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5
Dissoziationsrest	100	99,4	98,4	94,9	85	64	36	15	5,3	1,75

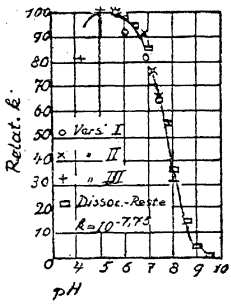


Fig. 13.

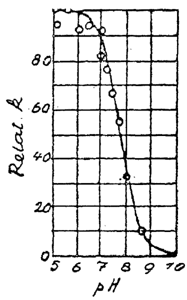


Fig. 14.

Die rechte Seite der Kurve ist also in diesem Falle besser als bei der Speicheldiastase mit Michaelis' Theorie vereinbar[1]), nach welcher das Enzym bzw. die Verbindung Enzymsubstrat als amphoterer Elektrolyt die Aziditätsbedingungen bestimmt. Vergl. hierzu I. Teil, S. 111 ff.

Was die Ergebnisse früherer Autoren betrifft, so stützt sich der erste exakt angegebene pH-Wert, nämlich der von Sörensen, auf Angaben Fernbachs. Adler[2]) fand ein Optimum zwischen 4,7 und 5,15. Sherman und Thomas[3]), welche als Optimum der Verzuckerung pH = 4,2 bis 4,6 angeben, haben einzelne Punkte elektrometrisch gemessen; eine pH-Kurve geben Sherman, Thomas und Baldwin[4]) in Fig. 11 an; danach liegt das Optimum bei pH = 4,4—4,5. A. Hahn und Harpuder[5]) finden als pH-Optimum 4,7.

Ernström findet das Optimum in Gegenwart von Natriumazetat als Puffer zwischen 4,7 und 5,0.

Während das Aziditätsoptimum des Ptyalins durch Salzzusätze verschoben wird[6]), zeigt die Malzamylase nach Hahn und Harpuder ihr Wirkungsoptimum bei Zusatz von Chlorid, Bromid, Nitrat und Sulfat an gleicher

[1]) Michaelis und Pechstein, Biochem. Zs 59, 77; 1914.
[2]) Adler, Biochem. Zs 77, 146; 1916.
[3]) Sherman und Thomas, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 623; 1915.
[4]) Sherman, Thomas und Baldwin, Jl Amer. Chem. Soc. 41, 231; 1919.
[5]) A. Hahn und Harpuder, Zs f. Biol. 71, 287 und 302; 1919.
[6]) Hahn (l. c. S. 17) glaubt, dass die Beeinflussung der Wirksamkeit des Enzymes durch Salze aus der Beeinflussung seines kolloiden Zustandes zu erklären ist.

Stelle, wie in reinem Azetatpuffer. „Die Wirkung des Salzzusatzes bei den einzelnen Reaktionen (Aziditäten) gibt hier ohne weiteres die Erklärung, wie folgendes Schema für Puffer n/50 und Salz n/25 zeigt:

	alkalisch			Optimum ohne Salz	sauer		
Azetatpuffer allein	1	2	3	[4]	5	6	7
Wirkung der Salze	+	+	+	±	—	—	—

Im Optimum selbst (Puffer 4) ist das Salz wirkungslos[1]). Bei sauren Reaktionen hemmt der Salzzusatz, bei alkalischeren fördert er." Vgl. hierzu S. 90. Hahn hebt noch zusammenfassend hervor, dass durch Hinzufügen von Alkalisalzen zur Amylase „die elektrische Natur des Enzyms von Grund auf verändert wird, ohne dass dies in der Wirkungsweise wesentlich zum Ausdruck käme". Die weitere kritische Prüfung dieses Ergebnisses ist natürlich für unsere allgemeinen Anschauungen über die Wirkungsweise von Enzymen von wesentlicher Bedeutung.

Im allgemeinen scheint Malzamylase von Kochsalz sehr viel weniger aktiviert zu werden als Ptyalin und die übrigen tierischen Amylasen.

Aktivatoren. Als anorganische Aktivatoren werden ausser den oben genannten neutralen Alkalisalzen noch die Salze des Vanadins und Aluminiums[2]) sowie des Eisens und Mangans[3]) angegeben. Bezüglich des Eisenchlorids haben die Messungen von U. Olsson keine Bestätigung erbracht (siehe unten). Weitere Prüfungen sind erwünscht.

Auch der wiederholt behauptete günstige Einfluss mancher organischen Aktivatoren, so z. B. derjenige von Aminosäuren (siehe auch unter Paralysatoren) dürfte auf Aziditätsbeeinflussung zurückzuführen sein. Ob beim Asparagin spezifische Wirkungen vorliegen, bleibt zu untersuchen.

Chinin soll (als basisches Salz) nach Gerber[4]) ein wenig aktivieren.

Paralysatoren.

Anorganische Stoffe. Die ersten brauchbaren Ergebnisse verdankt man Kjeldahl. In einer eingehenden Untersuchung hat U. Olsson neuerdings die Wirkung von Jod, von NaF, von mehreren Schwermetallsalzen und von Salzen der Molybdän- und Wolframsäure festgestellt[5]). Wie aus seinen Versuchen hervorgeht, schreitet die Einwirkung verschiedener Paralysatoren mit der Zeit fort, wenn man zunächst den Paralysator mit der Enzymlösung in Berührung bringt. Über die erforderlichen Zeiten gibt folgende Tabelle Aus-

[1]) Dieses Resultat wird durch die Versuche Ernströms bestätigt.
[2]) Effront, Die Diastasen, S. 126. — Soc. Biol. 57, 234; 1904.
[3]) Gigon und Rosenberg, Skand. Arch. Physiol. 20, 423; 1908.
[4]) Gerber, Soc. Biol. 71, 208; 1911.
[5]) Über die Wirkung von Jod siehe auch Berczeller und E. Fodor, Biochem. Zs 84, 112; 1917; Über die Wirkung von NaF auf Kartoffelamylase siehe Doby, Biochem. Zs 67, 166; 1914.

kunft. Die 2. Spalte der Tabelle gibt die molekular-normale Konzentration des Giftes in der substratfreien Lösung an, bezogen auf 1 mg organische Trockensubstanz des Enzyms.

Gift	Molekular-normale Konzentration des Giftes	Einwirkungsdauer (Inkubationszeit)	Verminderung der Aktivität des Enzyms in %
Jod	$1{,}39 \cdot 10^{-7}$	10 Min., 80 Min., 21 Std.	48, 56, 60
Phenylhydrazin . . .	$4{,}81 \cdot 10^{-4}$	10 Min., 40 Min., 6 Std.	72, 77, 90
Hydroxylamin . . .	$7{,}98 \cdot 10^{-4}$	30 Min., 16, 23, 43 Std.	8, 65, 67, 83
Semicarbazid . . .	$4{,}45 \cdot 10^{-5}$	10 Min., 4, 32 Std.	3, 3, 31
Na_2SO_3	$9{,}03 \cdot 10^{-4}$	10 Std.	64
Cyankalium	$2{,}14 \cdot 10^{-4}$	10 Min., 20 Std.	33, 58
H_4N-Molybdat . . .	$3{,}04 \cdot 10^{-3}$	15 Min., 3, 9, 22, 52 Std.	6, 6, 22, 38, 67
Na Wolframat . . .	$6{,}03 \cdot 10^{-4}$	10 Min., 5, 23 Std.	13, 72, 100
Natriumfluorid . . .	$3{,}0 \cdot 10^{-3}$	5 Std.	3
Leucin	$5{,}48 \cdot 10^{-3}$	26 Std.	5
Alanin	$2{,}80 \cdot 10^{-2}$	30 Min.	100

Für den zeitlichen Verlauf der Vergiftung liefert die Fig. 15 ein Beispiel.

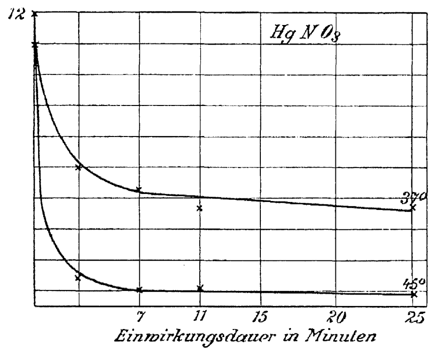


Fig. 15.

Etwa die Hälfte der normalen Aktivität der Malzamylase wird demgemäss erreicht, wenn im stärkehaltigen Reaktionsgemisch die obigen Substanzen in folgenden Konzentrationen vorhanden sind.

Gift	Konzentration	Gift	Konzentration
Jod	$1{,}74 \cdot 10^{-8}$	H_4N-Molybdat . .	$3{,}80 \cdot 10^{-4}$
Phenylhydrazin .	$6{,}01 \cdot 10^{-5}$	Na-Wolframat .	$7{,}54 \cdot 10^{-5}$
Hydroxylamin . .	$9{,}98 \cdot 10^{-5}$	Natriumfluorid .	$3{,}75 \cdot 10^{-4}$
Semicarbazid . .	$5{,}56 \cdot 10^{-6}$	Leucin	$6{,}85 \cdot 10^{-4}$
Na_2SO_3	$1{,}13 \cdot 10^{-4}$	Alanin	$3{,}50 \cdot 10^{-3}$
Cyankalium . . .	$2{,}68 \cdot 10^{-5}$		

Die folgende Tabelle U. Olssons gibt neben den Giftkonzentrationen (im Reaktionsgemisch) in einer 3. Spalte noch die Verminderung der Aktivität des Enzyms in Prozenten an (bei den betr. Stoffen ist die Inkubationszeit sehr klein).

Gift	Konzentration	Aktivitäts-Verminderung in %
Uranylsulfat . . .	$6{,}44 \cdot 10^{-4}$	57
Eisenchlorid . . .	$6{,}16 \cdot 10^{-3}$	11
Zinksulfat	$8{,}8 \cdot 10^{-2}$	13
Mercuronitrat . .	$1{,}78 \cdot 10^{-7}$	50
Mercurochlorid . .	$2{,}13 \cdot 10^{-7}$	50
Mercurichlorid . .	$6{,}04 \cdot 10^{-8}$	61
Formaldehyd . . .	$6{,}87 \cdot 10^{-3}$	50

Oligodynamische Wirkungen von Metallen. Dass diese Wirkungen auf den minimalen Mengen von Metallionen bzw. Metallhydroxyden beruhen, welche in die wässrige Umgebung des Metalls übergehen, braucht wohl kaum eigens erwähnt zu werden; siehe hierzu Baumgarten und Luger sowie H. Langer (Wien. klin. Woch. 30); ferner Falta und Richter-Quittner (Biochem. Zs 115, 39; 1921).

Organische Stoffe. Man findet in den obigen Tabellen von Olsson auch einige typische organische Gifte[1]).

Alkaloide sollen nach Goebel[2]) im allgemeinen nur wenig schädigen; dies gilt speziell bezüglich Strychnin nach Kjeldahl und bezüglich Akonitin nach Bywaters und Waller[3]).

Dass Äthylalkohol bis zu 50% nur wenig schädigt, geht aus den Arbeiten Shermans hervor.

Phenole sollen etwas hemmen. Siehe auch 1. Teil, S. 151 u. ff.

Kinetik.

Die zahlreichen Untersuchungen über die Kinetik der Stärkespaltung haben bis jetzt noch zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt. Dies hat seinen Grund teils in der Inhomogenität des Substrates, besonders aber darin, dass es sich hier nicht, wie etwa bei der Hydrolyse eines Esters oder einer Biose, um eine einfache Spaltungsreaktion handelt, sondern dass der Weg von der Stärke bis zur Maltose über eine Reihe von Zwischenprodukten führt, welche wir erst in allerletzter Zeit näher kennen gelernt haben. An der Bildung dieser Zwischenprodukte sind vermutlich mehrere Enzyme beteiligt, deren näheres Studium noch aussteht. Schon jetzt können wir aber annehmen, dass das Enzym, welches die Verflüssigung des Stärkekleisters bewirkt, ver-

[1]) Die älteste Untersuchung über Vergiftung der Amylase durch Formaldehyd stammt von O. Loew (1888). Siehe auch Berczeller und E. Fodor, Biochem. Zs 84.

[2]) Goebel, Biochem. Zbt. 4, 1356; 1905 (Orig. russisch).

[3]) Bywaters und Waller, Jl of Physiol. 40 (45) 1910.

schieden ist von dem Katalysator der Verzuckerung. Wie Karrer[1]) richtig hervorhebt, haben wir es beim Stärkeabbau zunächst mit einer Depolymerisation zu tun und dann mit eigentlichen hydrolytischen Reaktionen, welche von den Amylosen zur Maltose[2]) führen. Was bei kinetischen Untersuchungen bis jetzt im allgemeinen verfolgt wurde, ist eine — je nach der gewählten Methodik mehr oder weniger vollständige — Summe von Folgereaktionen. Dass demgemäss der Anschluss an die für einfache monomolekulare Reaktionen geltenden Gesetze und Beziehungen nicht gefunden wurde, kann nicht auffallen. Andererseits hat es unter den erwähnten Umständen nur einen bedingten Wert, empirische Formeln kennen zu lernen, welche sich den Versuchsergebnissen anschliessen. Ganz entbehren lassen sich solche Formeln nicht, da die Angabe der Wirksamkeit von Amylase- (Diastase-) -Präparaten sich auf kinetische Beobachtungen gründen muss.

Der gegenwärtige Stand der Forschung ergibt sich etwa aus Folgendem:

Es seien zunächst diejenigen Arbeiten erwähnt, welche sich mit den Wirkungsbedingungen der Malzamylase und mit dem zeitlichen Verlauf der Verzuckerung beschäftigen; auf die Verfahren, welche nur bezwecken, den Wirkungswert von Malz und Malzextrakten zu finden, kommen wir S. 134 u. ff. zurück.

Die ersten quantitativen Versuche über den Verlauf und die Bedingungen der diastatischen Wirkung des Malzextraktes verdankt man Kjeldahl[3]).

Brown und Glendinning[4]) haben sehr exakte systematische Versuche darüber angestellt, ob die Verzuckerung der löslichen Stärke sich der Formel für monomolekulare Reaktionen anschliesst.

Die folgende, ihrer Arbeit entnommene Tabelle bezieht sich auf die Verzuckerung einer 3%igen Stärkelösung durch 0,25 ccm Malzextrakt auf 100 ccm Lösung. Temperatur 51—52°.

Minuten	$1-x$	$k \cdot 10^4$	$k_1 \cdot 10^4$	Minuten	$1-x$	$k \cdot 10^4$	$k_1 \cdot 10^4$
10	0,8916	50	47	80	0,2615	73	51
20	0,7750	55	50	90	0,2200	73	50
30	0,6650	59	50	100	0,1850	73	50
40	0,5645	62	51	110	0,1500	75	50
50	0,4650	65	52	120	0,1200	76	50
60	0,3850	69	52	140	0,0780	79	50
70	0,3200	71	51	160	0,0500	81	49

[1]) Karrer, Nägeli, Hurwitz und Wälti, Helv. 4, 678; 1921.

[2]) Die Behauptung Lintners, dass bei der Spaltung der Stärke Isomaltose entstehe, kann nunmehr durch die mehrfachen Nachprüfungen besonders von Ling und Baker sowie von Brown und Morris (Jl Chem. Soc. 67) als widerlegt gelten.

[3]) Kjeldahl, Medd. Carlsberg-Lab. 1, 1879. — Zs ges. Brau. 1880.

[4]) Brown und Glendinning, Jl Chem. Soc. 81, 388; 1902.

3 %ige Stärkelösung mit 1 ccm Malzextrakt auf 100 ccm Lösung:

Minuten	1 − x	$k \cdot 10^4$	$k_1 \cdot 10^4$
10	0,92	37	35
20	0,84	39	36
40	0,69	40	34
	0,56	42	34
70	0,49	44	34

Die Konstante k der monomolekularen Formel steigt stark an, und das gleiche ist auch in den übrigen drei Tabellen der genannten Autoren der Fall. Brown und Gendinning haben die naheliegende Annahme geprüft, dass die beobachtete Steigerung der Konstanten davon herrührt, dass die zu Beginn der Reaktion entstehenden Dextrine leichter gespalten werden als das ursprüngliche Substrat; ihr Versuch mit Ausgangsmaterial, das verschieden weit vorgespalten war, hat keine Stütze für obige Annahme geliefert.

Für den Koeffizienten k_1 der Formel $k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{a+x}{a-x}$ finden sie eine angenäherte Konstanz.

V. Henri[1]) kam bald darauf zu einem Ergebnis, welches von demjenigen der beiden englischen Autoren insofern abwich, als er findet, dass die Konstanten k um einen gewissen Mittelwert schwanken; „la loi de formation du maltose est donc bien une loi logarithmique“.

Die folgende, seiner Arbeit entnommene Tabelle bezieht sich auf einen Versuch mit 3 %iger Stärkelösung und Malzamylase; Temperatur 25°.

Minuten	Gebildete Maltose	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^6$	Minuten	Gebildete Maltose	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^6$
29	0,090	0,046	707	184	0,552	0,284	788
53	0,179	0,092	790	227	0,641	0,330	766
89	0,283	0,146	769	326	0,865	0,446	787
113	0,358	0,184	781	402	0,977	0,504	757
150	0,459	0,236	779	467	1,121	0,578	802

Bei Variation der Stärkekonzentration findet Henri (S. 121) folgende Mengen Maltose in Gramm:

Datum 1902	Versuchsdauer in Minuten	Stärkekonzentration 3 %	1,5 %	0,75 %	0,375 %
5. 9.	60	0,192	0,174	0,145	—
6. 9.	40	0,180	0,154	0,124	—
11. 9.	40	0,130	0,114	0,112	0,082
20. 9.	30	0,098	0,104	0,100	—

Im Anschluss an diese Versuche wird die Formel

$$k_3 = \frac{a}{t} \left[(m-n)\frac{x}{a} + n \ln \frac{a}{a-x}\right] + \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

[1]) V. Henri, Lois générales de l'action des diastases. Thèse, Paris (1903).

vorgeschlagen; die Koeffizienten m und n werden aber nicht bestimmt, und demgemäss ist die Formel nicht geprüft.

Weitere Versuche über das Zeitgesetz der Verzuckerung findet man in den Arbeiten von Pottevin[1]), Effront[2]) und Ling und Davis[3]).

Die nächste eingehende Untersuchung über die Verzuckerung durch Malzamylase stammt von Frl. Philoche[4]). Ihren Bestimmungen nach folgt der zeitliche Verlauf der Verzuckerung von einem gewissen Spaltungsgrad an (etwa 30%) der monomolekularen Formel, vorher nimmt der Reaktionskoeffizient stark ab. Dies zeigt z. B. folgende Versuchsreihe, angestellt mit 2%iger Stärkelösung bei 31,5° (l. c. S. 371).

1 g „absol. Diastase“ in 50 Liter.

Minuten	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^4$	Minuten	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^4$
25	0,10	30,5	246	0,61	16,6
31	0,16	24,4	270	0,63	16,0
60	0,25	20,8	300	0,66	15,6
90	0,30	17,2	420	0,82	17,7
120	0,36	16,1	485	0,87	17,6
210	0,53	15,6			

Substratkonzentration. Über die aus verschiedenen Stärkekonzentrationen gebildete Menge Maltose gibt folgende Zusammenstellung (S. 277) Aufschluss:

Stärkekonz. in % . .	1	1,5	2	2,5	3
g Maltose in 60 Min. .	0,24	0,30	0,338	0,397	0,397.

Mit der Glykogenkonzentration nehmen die von der gleichen Enzymmenge gebildeten Maltosemengen regelmässig zu (l. c. S. 281).

Enzymkonzentration. Die Verzuckerung wird nicht direkt proportional mit der anwesenden Diastasemenge gefunden. Bedeutet x die zur Zeit t gebildete Maltosemenge, c die Konzentration des Enzyms in g per 100 ccm Lösung, so ist x/c nicht konstant, sondern es gilt eine Beziehung

$$\frac{x}{c} = B - Ac \quad \text{oder} \quad x = Bc - Ac^2.$$

Für Glykogen als Substrat stimmen diese Beziehungen nicht ohne weiteres, wenn auch im wesentlichen eine ähnliche Abhängigkeit von x und c gefunden wurde.

Klempin[5]) schliesst aus einigen Versuchen mit Haferdiastase, dass für dieses Enzym die Schützsche Regel (vgl. Teil I, S. 124) gilt.

[1]) Pottevin, Ann. Inst. Pasteur 13, 665; 1899.
[2]) Effront, Les enzymes et leurs applications (Paris 1899).
[3]) Ling und Davis, Jl Inst. Brew. 8, 475; 1902.
[4]) Ch. Philoche, Jl de Chim. Phys. 6, 212 u. 355; 1908.
[5]) Klempin, Biochem. Zs 10, 206; 1908.

Henri van Laer hat eine grosse Reihe von Experimentalbeiträgen zu dem hier besprochenen Thema geliefert[1][2][3]. Er kommt zu dem Ergebnis, dass bis zu einer Stärkekonzentration von 4,5% die Verzuckerung sich der Formel für monomolekulare Reaktionen anschliesst[1d]. Dabei ist eine geeignete Enzymkonzentration vorausgesetzt; wird das Malzenzym durch Verdünnung oder Erhitzung geschwächt, so liefern die einzelnen Verzuckerungsversuche abnehmende Reaktionskoeffizienten erster Ordnung. Henri van Laer schliesst sich, wie auch Marc H. van Laer[4], der Auffassung an, dass die Konzentration der Verbindung Amylase-Stärke, also die Konstante des Gleichgewichtes zwischen Enzym und Substrat die Dynamik der enzymatischen Verzuckerung bestimmt.

Die neueren Versuche von Sherman und Jennie A. Walker sind unter Einhaltung einer bestimmten, nahezu optimalen Azidität (pH = 4,4) ausgeführt und deswegen in höherem Grad anwendbar als ältere Ergebnisse.

Der zeitliche Verlauf wird durch folgenden Auszug aus der Tabelle IV (Jl Amer. Chem. Soc. 39, 1489, 1917) deutlich:

Die Versuche beziehen sich auf 1% Stärke; Puffer KH_2PO_4.

Stunden	0,000025% Enzym		0,00005% Enzym		0,00010% Enzym	
	Maltose in % der Theorie	$k \cdot 10^5$	Maltose in % der Theorie	$k \cdot 10^5$	Maltose in % der Theorie	$k \cdot 10^5$
1	8,7	64	20,8	168	32,9	288
2	16,7	65	31,3	135	52,8	271
4	30,9	66	52,1	133	69,8	216
6	42,3	66	64,2	123	72,9	157
8	52,6	67	72,8	117	73,7	120
30	68,7	27	73,5	32	75,8	34
48	71,3	18	76,0	21	78,9	23
72	71,4	12	76,4	14	79,1	17
96	72,7	9	77,8	11	79,9	12

Sherman und Walker ziehen aus ihren Versuchen u. a. folgende Schlüsse: Wenn in vergleichbaren Versuchen die Enzymkonzentration in gewissen Grenzen variiert wird, so findet man den Grad der Maltosebildung direkt proportional der Enzymkonzentration bis zu etwa dem halben Betrag des theoretisch möglichen Wertes.

Bis zur gleichen Grenze ist unter vergleichbaren Umständen und günstigem pH der Grad der Maltosebildung aus löslicher Stärke proportional der Substratkonzentration.

[1] H. van Laer, Bull. Acad. roy. de Belg. a) nr. 7, 611; 1910. — b) nr. 9—10, 707; 1910. — c) nr. 2, 84; 1911. — d) nr. 3, 305; 1911. — e) nr. 4, 362; 1911. — f) nr. 11, 795; 1911. — g) nr. 4, 395; 1913.

[2] H. van Laer, Bull. Soc. chim. de Belg. 26, 18; 1912.

[3] H. van Laer, Bull. Soc. roy. Sc. med. et nat. de Bruxelles nr. 5; 1913.

[4] Marc H. van Laer, Bull. Soc. chim. de Belg. 29, 214; 1920.

Schliesslich seien noch einige Resultate erwähnt, die Verf. mit Svanberg[1]) gewonnen hat. Bezüglich des zeitlichen Verlaufes erwies sich das erste Stadium der Verzuckerung als eine angenähert monomolekular verlaufende Reaktion, wobei aus 1 g Stärke rund 750 mg Maltose entstehen. In den Figuren 16 und 17 sind die beobachteten Zuckermengen durch ×, die aus den Reaktionskonstanten 0,044 und 0,078 berechneten durch ○ eingetragen.

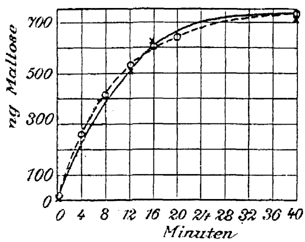


Fig. 16.

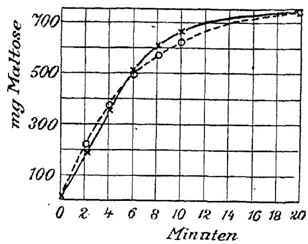


Fig. 17.

Die bei 37° festgestellte Spaltungsgrenze erwies sich bei 52° nur wenig verschoben. Nach Ablauf des ersten Reaktionsstadiums schreitet dann die Maltosebildung, bedeutend verlangsamt, weiter fort.

Die für das erste Stadium berechneten Reaktionskonstanten sind der Enzymkonzentration recht angenähert proportional, wie die folgende Tabelle zeigt; nur bei der Enzymmenge 0,1 ccm wurde eine Abweichung gefunden.

	k	k : Enzymmenge
2 ccm dialysierte Lösung	0,045	0,0225
1 „ „ „	0,022	0,022
0,5 „ „ „	0,011	0,022
0,2 „ „ „	0,0040	0,020
0,1 „ „ „	0,00164	0,0164

Bei einer Versuchsreihe über den Einfluss der Substratkonzentration waren die Versuchslösungen folgendermassen zusammengesetzt:

25 ccm 4%ige Stärkelösung
10 ccm Phosphatgemisch (p_H 5,6)
1 ccm dialysierte Enzymlösung 1
36 ccm

25 ccm 2%ige Stärkelösung
10 ccm Phosphatgemisch (p_H 5,6)
1 ccm dialysierte Enzymlösung 1
36 ccm

25 ccm 1%ige Stärkelösung
10 ccm Phosphatgemisch (p_H 5,6)
1 ccm dialysierte Enzymlösung 1
36 ccm

[1]) Euler und Svanberg, H. 112, 193; 1920.

Die Resultate werden in folgender Tabelle angegeben:

Relative Stärkemenge	k	k · Substratmenge
4	0,0115	0,023
2	0,022	0,022
1	0,044	0,022

Was die Abweichung des Verzuckerungsverlaufes von der Formel für monomolekulare Reaktionen sowie die Tatsache betrifft, dass die Verzuckerung zunächst nicht vollständig verläuft, so ist mehrfach erwogen worden, ob nicht die Umkehrbarkeit der Reaktion die Ursache ist, bzw. ob nicht die Reaktion bei ihrem natürlichen Gleichgewicht Stärke $\rightleftarrows$ Maltose zum Stillstand kommt. Dies ist bei so verdünnten Stärkelösungen, wie sie hier in Betracht kommen (2—3%), nicht der Fall, wie besonders aus den Versuchen von Wohl und Glimm[1]) hervorgeht.

Der Umstand, dass bei der enzymatischen Verzuckerung die Reaktionskoeffizienten erster Ordnung meist fallend gefunden wurden, hat mehrfach zu der Annahme Veranlassung gegeben, dass der einleitende Teilvorgang, welcher das Ausgangsmaterial spaltet, zur Bildung von Zwischenprodukten (Dextrinen) führt, die einer langsameren Spaltung unterliegen. Eine Prüfung dieser Annahme durch Brown und Glendinning hat zu einem negativen Resultat geführt, insofern keine erheblichen Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit nachgewiesen werden konnten. Auch Henri van Laer (l. c.) hat ähnliche Versuche angestellt.

Ein näherer Einblick in den Mechanismus der Stärkespaltung, welchen sonst kinetische Messungen gestatten könnten, wird dadurch erschwert, dass noch keine für die Zwischenprodukte charakteristische Reaktion bekannt ist, womit ihre Konzentration im Verlauf der Gesamtreaktion festgestellt werden könnte. Einstweilen bietet die Molekulargrösse den einzigen Anhaltspunkt. Biltz[2]) hat versucht, in dieser Weise die Bildung der Zwischenprodukte zu verfolgen; er mass während der enzymatischen Spaltung einer Stärkelösung gleichzeitig die Farbenänderung nach Jodzusatz und die Änderung der Viskosität, welche nach Biltz und Truthe[3]) in direkter Beziehung zum Molekulargewicht stehen soll. Biltz nimmt für die Amylodextrine ein Molekulargewicht von über 10000 an, die für Erythrodextrine 6200—7000 und für die Achroodextrine etwa 3700. Er schliesst aus seinen Versuchen, dass die „Verzuckerungsgeschwindigkeit der Achroodextrine kleiner ist als die der Erythrodextrine, und diese wieder kleiner als die der Amylodextrine". Die Natur der Sache bringt es mit sich, dass diesen Schlüssen erhebliche Unsicherheiten anhaften.

[1]) Wohl und Glimm, Biochem. Zs 27, 349; 1910.

[2]) Biltz, Chem. Ber. 46, 1532; 1913.

[3]) Biltz und Truthe, Chem. Ber. 46, 1377; 1913.

Mit einiger Sicherheit lässt sich einstweilen nur der Verlauf der Gesamtreaktion, d. h. der Maltosebildung, mit dem Verschwinden des durch Jod blau gefärbten Ausgangsmaterials und der nächsten Abbauprodukte vergleichen.

Euler und Svanberg haben untersucht, ob das erste Stadium der Reaktion das Endresultat beeinflussen kann, oder ob die Stärke so schnell verbraucht wird, dass diese einleitende Reaktion — wie bei der Vergärung des Rohrzuckers durch Hefe — auf die Bildungsgeschwindigkeit des Endproduktes ohne erheblichen Einfluss ist.

Minuten	Jodfärbung	mg Maltose
10	blau	118
15	blauviolett	—
18	blauviolett	—
21	rotviolett	210
24	rotgelb	—
27	gelbrot	—
30	gelb	279
60	farblos	286

Die Stärkereaktion (und die Amylodextrinreaktion) verschwinden also erst, nachdem etwa 75% der in der 1. Reaktionsphase entstehenden Maltose gebildet sind.

In diesem Zusammenhang sei auch an die Versuche von Sherman und Schlesinger[1]) erinnert, welche auch für Malz und verschiedene Malzpräparate die „amyloklastische Kraft" und die „verzuckernde Kraft" an löslicher Stärke getrennt ermittelt haben, und zwar die erstere nach der Jodmethode von Wohlgemuth (S. 136), letztere gravimetrisch nach Sherman, Kendall und Clark (S. 138). Den Ergebnissen von Sherman und Schlesinger zufolge kann bei der Untersuchung von Malzamylase das Verschwinden der Jod-Stärke-Farbe in der Reaktionsmischung nicht als Kriterium für die stärkespaltende Fähigkeit des Enzyms dienen; „with malt extracts the quantitative relation between the amyloclastic and saccharogenic figures is possible, though not probable; with precipitated malt amylase the indicated relation is plainly impossible".

Auf das verschiedene Verhältnis der „amyloklastischen" und der verzuckernden Fähigkeit diastatischer Präparate kommen wir bei der Takadiastase (S. 129) zurück.

Verwendet man als Substrat nicht verdünnte Lösungen „löslicher Stärke", sondern Stärkekleister, also Stärke im Gelzustand, so nimmt man unter der Einwirkung diastatischer Enzyme zunächst eine Verflüssigung wahr. Dieser Verflüssigungsvorgang, welcher vermutlich in einer Depolymerisation von Stärkekomplexen, besonders des „Amylopektins", besteht, ist oft nicht scharf genug von der Verzuckerung geschieden worden, wenn auch einzelne

[1]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1784; 1913.

Versuche nicht gefehlt haben, jeden der beiden enzymatischen Prozesse für sich zur Erscheinung zu bringen. Neuerdings hat Urban Olsson im hiesigen Laboratorium die verflüssigende Wirkung von Malzamylase nach eigener Methode (vgl. S. 135 u. Fig. 19) gemessen und mit der verzuckernden Wirkung (Fig. 18) verglichen.

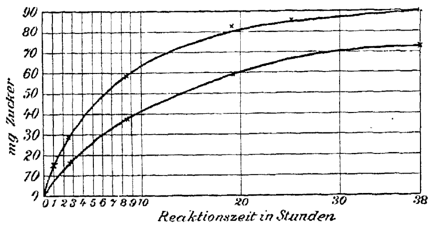


Fig. 18.

Nachdem Frl. Tebb, Brown und Morris, Röhmann, Hamburger und Beijerinck in dem stärkeverzuckernden Enzymgemisch ein Enzym nachgewiesen hatten, welches die Spaltung Stärke in Maltose bewirkt und ein anderes, welches die Maltose weiter zu Glukose abbaut, nehmen Wijsman[1]), Pottevin[2]), Fernbach[3]), Ascoli und Bonfanti[4]) u. a. für die Reaktionen: Stärke-Dextrin und Dextrin-Maltose je ein besonderes Enzym an.

Über die fraktionierte Fällung des stärkelösenden und des verzuckernden Enzyms mit Ammoniumsulfat macht Chrzaszcz Angaben[5]).

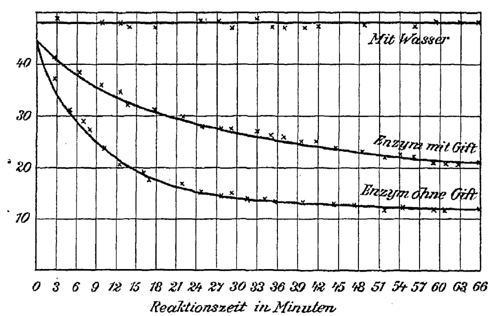


Fig. 19. Vergiftung mit $1{,}7 \cdot 10^{-6}$ n. $CuSO_4$.

Die bemerkenswerte Untersuchung von Sherman und Thomas[6]) zeigt, dass die verzuckernde Wirkung (gemessen durch Reduktion der Lösung) und die stärkespaltende Wirkung (gemessen durch die Jodmethode von Wohl-

---

[1]) Wijsman, Rec. Trav. Chim. Pays. Bas. 9, 1; 1890.

[2]) Pottevin, Ann. Inst. Pasteur, 13, 665; 1899.

[3]) Fernbach und Schön, C. r. 151, 894; 1910.

[4]) Ascoli und Bonfanti, H. 43, 156; 1904.

[5]) Chrzaszcz, Wochenschr. f. Brau. 28, 510; 1911. — Nach Fränkel und Hamburg (Hofm. Beitr. 8, 389; 1906) soll bei der Dialyse der Amylase nur der verzuckernde Anteil dialysieren. Zum gegenteiligen Ergebnis kam Reinitzer (H. 61, 352; 1909) hinsichtlich der Amylase des Gummis. Daselbst wird auch — allerdings ohne Zahlenangaben — ein Fall erwähnt, in welchem durch Sublimatzusatz die relative Wirkung des verzuckernden und stärkelösenden Enzyms verschoben wurde.

[6]) Sherman und Thomas, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 623; 1915.

gemuth) von äusseren Umständen, wie Azidität usw., ungleich beeinflusst werden. Bei höherer Temperatur (ca. 60°) soll die Verzuckerung gegen die primäre Stärkespaltung (Depolymerisation der Stärke) zurücktreten[1].

Ein Vergleich der Reaktionszeiten ergibt, dass die Verzuckerung erst einsetzt, wenn die Verflüssigung im wesentlichen beendet ist.

Temperatur.

Über die Temperaturempfindlichkeit der diastatischen Malzenzyme selbst ist bis jetzt nur wenig bekannt. Die Stabilität ist, wie immer, stark von der Azidität abhängig, in zweiter Linie ein wenig vom Puffergehalt der Lösung, vom NaCl-Gehalt wird dagegen die Stabilität der Malzamylase im Gegensatz zu derjenigen des Ptyalins fast gar nicht beeinflusst, wie genaue Versuche von Ernström gezeigt haben. In Gegenwart von Alkaliphosphat liegt das Aziditätsoptimum der Stabilität bei etwa pH = 6, in Gegenwart von Natriumazetat bei 5,5 (Fig. 20), also wesentlich verschoben gegen das Aziditätsoptimum der Verzuckerung.

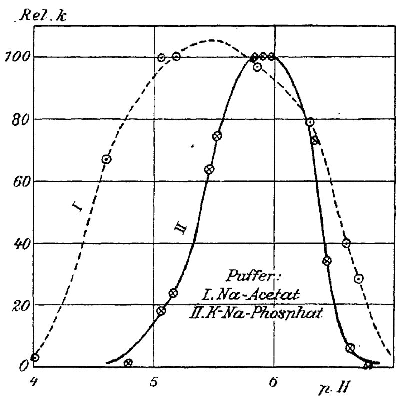


Fig. 20.

Die Untersuchung von Ernström hat für die Stabilitätskonstante k_C (vgl. Teil I, S. 173 u. ff.) folgende Werte ergeben:

45°	$k_C \cdot 10^3 = 0{,}2$	56,5°	$k_C \cdot 10^3 = 7{,}5$
50°	1	58°	14
55°	4,8	60°	38.

Definiert man mit dem Verf. (Teil I, S. 189 u. ff.) die Tötungstemperatur als diejenige, bei welcher das Enzym in wässeriger Lösung (ohne Substrat) bei optimalem pH nach 60 Minuten langem Erhitzen auf die Hälfte der Aktivität sinkt[2], so ergibt sich für Malzamylase 55—56°.

Die Stabilität des verzuckernden Enzyms wird durch Maltose bedeutend erhöht, während nach Wohl[3]) das verflüssigende Enzym besonders durch die Stärke geschützt werden soll. Eine Reihe von Angaben über den Einfluss der Temperatur findet man auch in den bereits zitierten Arbeiten von Henri van Laer, 1910—1912. Nach seinem Befund wird die Amylase durch Erwärmen dahin verändert, dass sie abnehmende Reaktionskoeffizienten erster

[1]) Ältere Versuche über das Verhältnis der Verflüssigungs- und Verzuckerungsgeschwindigkeit findet man in Effronts Arbeiten. Siehe die Monographie dieses Verfassers.

[2]) Nach Klempin (Biochem. Zs 10, 204; 1908) soll das amylolytische Haferenzym (untersucht nach der Jodmethode) erst bei einer Temperatur von 90—95° vollständig wirkungslos werden; die Versuche bedürfen der Nachprüfung.

[3]) Wohl und Glimm, Biochem. Zs 27, 349; 1910.

Ordnung liefert (Bull. 26, 18). Es würde dies darauf hindeuten, dass die Enzymkomponenten verschiedene Stabilität besitzen.

Der Einfluss der Temperatur auf die Geschwindigkeit der Stärkespaltung und Verzuckerung ist schon in zahlreichen Arbeiten untersucht worden, oft aber ohne Einhaltung der massgebenden Bedingungen. Zwischen 20° und 30° ist der Temperaturkoeffizient[1] $k_{20} : k_{30}$ sehr nahe $= 2$; die Konstante der im Teil I, S. 172 u. ff. erwähnten Temperaturformel (29) ist demgemäss (abgerundet) $A = 12000$. Der gleiche Temperaturkoeffizient gilt auch angenähert für Kartoffelamylase (Doby[2]).

Einfluss der Bestrahlung. Eine grundlegende Untersuchung verdankt man Green[3]), welcher besonders die starke Schädigung der ultravioletten Strahlen nachwies.

Bezüglich des Zymogen-Stadiums der stärkespaltenden Enzyme sei hier in historischer Hinsicht auf die Arbeiten von A. Brown und Morris[4]), von Green und von Reychler verwiesen. Ob es sich beim Übergang vom Zymogenzustand in den Enzymzustand innerhalb lebender Organe um etwas anderes als eine Aktivierung durch Elektrolyte u. dergl. handelt, scheint noch nicht bewiesen.

In diesem Zusammenhang mag erwähnt werden, dass die von Biedermann (Fermentforsch. 1—4) behauptete Neubildung von diastatischen Enzymen ausserhalb lebender Zellen nach Wohlgemuths, Sallingers und Teschendorfs negativen Ergebnissen vermutlich auf Bakterienwirkungen zurückgeführt werden müssen.

Enzymbildung. In der oben erwähnten Arbeit von K. Sjöberg ist die Amylasebildung in Samen, besonders an zwei Arten der Gattung Phaseoleae eingehend studiert. Als Beispiel sei die Versuchsreihe mit Phaseolus vulgaris nanus angegeben (bezüglich Sf siehe S. 142).

In der angekeimten Bohne entspricht die Amylasewirkung einem Sf-Wert von 0,0054; 8 Tage nach Beginn der Keimung ist Sf = 0,0253;

nach 14 Tagen Sf = 0,110; nach 17 Tagen 0,350;
„ 16 „ 0,253; „ 32 „ 2,09.

Diese Werte beziehen sich zunächst auf die Bohne selbst, dann, wenn sich die Pflanze entwickelt, für den als Herzblatt noch festsitzenden Teil der ursprünglichen Bohne. Am grössten ist indessen die Enzymwirkung in dem noch unentwickelten Blatt; Maximum am 31. Tag mit Sf = 4,92.

---

[1]) Green (Die Enzyme, S. 31 und 65) nimmt für die Translokations- und die Sekretionsdiastase verschiedene Temperatureinflüsse an.

[2]) Doby, Biochem. Zs 67, 166; 1914.

[3]) Green, Phil. Trans. B. 188, 167; 1897. — Siehe auch Chauchard und Mazoné, C. r. 152, 1709; 1911.

[4]) Brown und Morris, Jl Chem. Soc. 57, 493; 1890.

2. Amylasen in Kryptogamen.

Seit Kossmann 1877 Amylasen in Pilzen nachgewiesen hat, ist das Vorkommen dieser Enzyme in zahlreichen Mikroorganismen bekannt geworden. Was die Eigenschaften der Kryptogamenamylasen betrifft, so weisen die diastatischen Enzyme der verschiedenen Pilze und Bakterien Unterschiede auf, sowohl hinsichtlich der relativen Menge der verflüssigenden und verzuckernden Enzyme als hinsichtlich der Temperaturstabilität, der optimalen Azidität usw., Unterschiede, welche als das Ergebnis der Anpassung an die äusseren Lebensverhältnisse aufzufassen sind.

Als besondere Anpassungserscheinung an das Nährsubstrat ist hier die Enzymbildung besonders zu erwähnen, über welche bereits eine reiche Literatur existiert. Ich verweise bezüglich dieser biologisch sehr interessanten Vorgänge auf die ausgezeichnete Monographie von H. Pringsheim, Die Variabilität niederer Organismen (Berlin 1910).

Es würde hier zu weit führen, auf alle Einzelbeobachtungen über Kryptogamenamylasen einzugehen und es muss daher ein Hinweis auf einige grundlegende oder umfassende Arbeiten genügen, in welchen man weitere Literaturangaben findet.

	Verfasser	Schriftstelle
Polyporaceen.	Zellner	Sitz.-Ber. Akad. Wien IIb.
Aspergillaceen.	Duclaux	Chimie biologique 1883.
	Wehmer	Bot. Ztg. 49, 233; 1891. — Lieb. Ann. 269, 383; 1892.
	Effront	C. r. 95, 1324; 1892.
	Bourquelot	Bull. Soc. Mycol. France, 9, 230; 1893 und 10, 235; 1894.
	Laborde	Ann. Inst. Pasteur, 11, 1; 1897.
	Fernbach	Ann. Brass. 2, 409; 1899 und C. r. 131, 1214; 1900.
	Schäffer	Diss. Erlangen 1901.
	Heinze	Zbt. Bakt. II, 12, 180; 1904.

Ältere Ergebnisse, dass die Amylasebildung bei Aspergillus niger durch Stärkezusatz zur Nährlösung gefördert wird, konnten durch neuere Versuche von Euler und Asarnoj[1]) gestützt werden.

Aspergillus Oryzae. Taka-Diastase.

Der in Ostasien sehr verbreitete Pilz Aspergillus Oryzae spielt in Japan zur Bereitung von Saké, Soyasauce (Shoju) und Bohnenbrei (Miso) eine technisch wichtige Rolle.

Im Koji, das zur Herstellung des japanischen alkoholischen Getränkes Saké dient, finden sich Aspergillus Oryzae und einige andere Pilze symbiotisch mit Saccharomyzeten. Kokichi Oshima hat neben Aspergillus Oryzae noch Asp. effusus und Asp. flavus isoliert und charakterisiert.

[1]) Euler und Asarnoj, Fermentforsch. 3, 318; 1920. — Über Amylasebildung in Schimmelpilzen siehe auch Boas, Biochem. Zs 78, 308 und 79, 80; 1917 sowie Bot. Ber. 37, 50; 1919.

In neuerer Zeit ist die in diesem Pilz schon 1876 entdeckte Amylase[1]), die sog. Taka-Amylase, von japanischen Forschern, besonders von Takamine und seinen Mitarbeitern und ausserdem im Sherman'schen Laboratorium eingehend studiert worden.

Morphologische Beschreibung des Pilzes: Wehmer, Zbt. Bakt. II, 1, 150; 1895. — Klöcker und Schiönning, Ebenda S. 782. — Saito, Ebenda 17, 20; 1906.

Substrat: Die Verwendung von Stärke als Substrat für die Amylasewirkung haben Sherman und Baker[2]) eingehend besprochen. Sie finden, dass bei Anwendung von Lintner-Stärke, im Autoklaven behandelter Stärke und von α-Amylose (Amylopektin) Maltose in gleicher Menge gebildet wird, während Maquenne's Amylose (β-Amylose) etwas mehr Maltose liefert, relativ weniger Glukose. Maltose ist jedenfalls auch bei der Stärkespaltung durch Aspergillus Oryzae Hauptprodukt, Glukose Nebenprodukt, wie Sherman und Punnet[3]) angeben.

Darstellung. Koji enthält u. a. die Sporen mehrerer Pilze, besonders des Aspergillus Oryzae. Durch Reinkultur auf geeigneten Nährböden kann das Material an diastatischem Enzym angereichert werden. Durch Behandlung mit Wasser kann hieraus ein äusserst wirksamer Extrakt gewonnen werden[4]).

Takadiastase des Handels kann nach Sherman und Tanberg[5]) bis auf das 30fache der ursprünglichen Wirksamkeit angereichert werden durch Extraktion mit Wasser, Ausfällen mit Ammoniumsulfat, Dialysieren und fraktionierte Fällung mit Alkohol. Die gereinigten Produkte zeigen noch folgende Proteinreaktionen: Millon, Xanthoproteinr., Tryptophanr., Biuretr.

Charakteristisch für die diastatischen Präparate aus Aspergillus Oryzae ist das hohe Verhältnis der stärkespaltenden und der verzuckernden Fähigkeit (etwa 8 : 1).

Ein nach besonderem Verfahren (ohne Alkohol) im Takamine-Laboratorium dargestellter Extrakt, Polyzime, ist neuerdings von Takamine jr. und Kokichi Oshima[6]) studiert worden. Die stärkespaltende Fähigkeit, gemessen nach Wohlgemuth, geben diese Forscher zu $D^{40^0}_{30\,\mathrm{min}} = 3000$ an, die verzuckernde Fähigkeit beträgt

	21°	50°
Lintner-Einheiten	43	150
Sf.	1,1	3,9.

[1]) Der Pilz sowie die Takadiastase sind sehr reich an kräftig wirksamen Enzymen; siehe z. B. Wohlgemuth, Biochem. Zs 39, 324; 1912.

[2]) Sherman und Baker, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1885; 1916.

[3]) Sherman und Punnet, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1877; 1916.

[4]) Siehe J. Takamine, Jl Soc. Chem. Ind. 17, 118; 1898.

[5]) Sherman und Tanberg, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1638; 1916.

[6]) Takamine jr. und K. Oshima, Jl Amer. Chem. Soc. 42, 1261; 1920.

Die chemische Zusammensetzung ist nach Takamine und Oshima:

Wasser 87,5% Feste Substanzen 12,5% Asche 1,5%.

Der Extrakt hält sich bei gewöhnlicher Temperatur etwa 1/2 Jahr ohne wesentliche Schwächung der diastatischen Fähigkeiten.

Aziditätsbedingungen: Sherman, Thomas und Baldwin geben als Aziditätsoptimum pH = 4.8 an (vgl. S. 100, Fig. 11, Kurve III), und zwar sind die Optima der stärkespaltenden und der verzuckernden Wirkung nach Sherman und Tanberg[1]) wenig voneinander verschieden.

Neutralsalze. Nach Sherman und Tanberg und Saito[2]) üben NaCl und KCl keine bedeutende Aktivierung aus; in dieser Hinsicht verhält sich also Takaamylase wie Malzamylase. Wohlgemuth gibt an, dass die Stärkespaltung zwar nicht durch kleine Salzmengen, aber durch NaCl-Konzentrationen von 0,1 norm. an gefördert werde.

Kinetik. Wesentlich für die Kinetik der Takadiastase ist einerseits der Befund von Sherman und Punnet, dass unter der Einwirkung dieses Präparates neben Maltose auch nicht unbedeutende Mengen Glukose gebildet werden, und andererseits, dass, wie schon erwähnt, die Depolymerisationsfähigkeit sehr hoch ist gegenüber der Verzuckerungsfähigkeit (Sherman und Tanberg). Dieser beiden Umstände wegen ist es natürlich nicht leicht, für die Vorgänge, welche unter der Einwirkung dieser Diastasen eintreten, eine einfache und übersichtliche reaktionskinetische Darstellung zu finden. Es kann deshalb auch von einer ausführlichen Wiedergabe von Zahlen bis auf weiteres abgesehen werden. Nur einige Ergebnisse von Ch. Philoche (l. c. S. 377) über den zeitlichen Verlauf der Stärkespaltung seien angeführt:

Taka-Diastase 1 : 20000. Temp. 31,5°.

1% Stärke			2% Stärke			3% Stärke		
Min.	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^4$	Min	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^4$	Min.	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^4$
21	0,06	12,3	19	0,05	11,7	15	0,08	24,1
51	0,11	10,0	39	0,07	7,9	75	0,11	6,7
113	0,15	6,2	55	0,08	6,6	126	0,16	6,0
224	0,26	5,8	208	0,18	4,1	248	0,25	5,0
390	0,36	5,0	275	0,20	3,5	307	0,28	4,6
			453	0,34	3,7	450	0,40	4,1

Temperatur. Die Stabilität der Amylase aus Aspergillus Oryzae scheint nach der Mitteilung von Takamine jr. und Oshima und nach weiteren Messungen des letzteren Forschers von derjenigen der Malzamylase nicht sehr verschieden zu sein. Das Enzym ist stabil unter 37° und wird

1) Sherman und Tanberg, Jl Amer. Chem. Soc. 8, 1638; 1916.

2) Saito, Zbt. Bakt. II, 17, 20; 1906.

bei 60° schon durch ½stündiges Erhitzen vernichtet; die Tötungstemperatur dürfte bei etwa 56° liegen. Das stärkeverflüssigende Enzym soll eine hohe Temperaturtoleranz besitzen (über angebliche Regeneration siehe Gramenitzky, H. 69).

Physiologische Wirkung. Nach Einspritzung wurde Hyperglykämie beobachtet.

Enzymbildung. Man verdankt Saito[1]) eine Untersuchung über den Einfluss verschiedener Nährböden auf die Amylasebildung des Aspergillus Oryzae, auf welche hier verwiesen sei.

Technische Anwendungen der Takadiastase.

Die Anwendung der diastatischen Wirkung des Aspergillus Oryzae ist in den ostasiatischen Ländern, besonders in Japan, sehr gross und mannigfach. Das Hauptmaterial ist der bereits genannte Koji; es ist dies eine Pilzvegetation des Aspergillus Oryzae auf dem Gemisch der gekochten Sojabohnen mit gebranntem Weizen.

Soja-Fabrikation. Einer Mitteilung von Saito sei folgendes entnommen[2]): Der Weizen wird in grossen Eisenpfannen gleichmässig gebrannt und zerkleinert, wobei er sich dunkel färbt und einen angenehmen Geruch annimmt. Die Sojabohnen werden zunächst in kaltem Wasser gequellt, dann im Dampfstrom gekocht, und nach Abkühlen im lauwarmen Zustand mit dem vorbehandelten Weizen innig gemischt. Die Mischung wird in flachen Kästchen bei etwa 25—30° der Infektion durch Keime des Asp. Oryzae während 2—3 Tagen ausgesetzt. Der Pilz entwickelt sich nun schnell unter intensiver Atmung und Erwärmung auf etwa 40°. Nach dieser Bereitung des Koji erfolgt das Maischen unter Zusatz von Kochsalz und Wasser. Die darauf folgende Gärung, bei welcher auch die proteolytischen Enzyme des Pilzes stark in Wirksamkeit treten, nimmt im Durchschnitt 1 Jahr in Anspruch. Die Sojasauce (welche der Anwendung und Wirkung nach etwa unserem Fleischextrakt entspricht[3])), enthält rund 30% Trockensubstanz; man findet darin neben etwa 10% Kochsalz Ammoniak, Aminosäuren, Xanthinbasen, freie Säuren, darunter Milchsäure und endlich Alkohol.

Miso (Bohnenbrei) wird ebenfalls aus Koji hergestellt und zwar in ähnlicher Weise wie Soja; die Eiweissspaltung ist aber hier weniger weitgehend.

Der Saké, ein in Japan beliebtes Getränk, welches 12—15% Alkohol enthält, wird aus Reiss bereitet, welcher durch Koji verzuckert wird. Gedämpfter Reis wird unter Zusatz von Wasser mit Koji eingemaischt und der dicke Brei zunächst bei niederer Temperatur (10°) sich selbst überlassen.

[1]) Saito, Wochenschr. f. Brau. 27, 181; 1910.

[2]) Siehe auch die Arbeit von Nishimura. Bull. Coll. Agric. Tokyo. 3. 194.

[3]) Siehe Kellner, Chem.-Ztg. 1895, sowie Kellner, Mori und Nagaoka. H. 14.

Die Masse verflüssigt sich und es tritt, während die Temperatur allmählich auf 20—30° steigt, alkoholische Gärung ein. Die dazu erforderliche Hefe stammt teils aus dem angewandten Koji her, teils aus den Keimen in der Luft des Gärungskellers[1]).

Mucoreen.

Die bei den ostasiatischen Völkern seit alten Zeiten ausgenutzte Fähigkeit einzelner Mucoreen, Stärke zu verzuckern, wurde 1887 von Gayon und Dubourg an Mucor racemosus und einigen anderen Arten studiert. Unter den wichtigsten Arbeiten seien erwähnt:

Mucor	Verfasser	Schriftstelle	Bemerkung
Amylomyces Rouxii	Calmette	Ann. Pasteur 6, 605: 1892	Isoliert aus der „tonkinesischen Hefe".
Mucor alternans	Sanguineti	Ann. Pasteur 11, 264; 1897.	
Rhizopus Oryzae und Chlamydomucor Oryzae	Went u. Prinsen Geerligs	Verh. K. Akad. v. Wetensch. Amsterdam II, 4. Nr. 2.	
Rhizopus tonkinensis Rhizopus japonicus	Colette und Boidin	Bull. Assoc. Chim. de sucr. et distill. 16, 862.	
Rhizopus japonicus	Henneberg	Zs Spir. Ind. 25, 205; 1902.	

Über diastatische Wirkungen sonstiger Mucoreen siehe die Tabelle in Lafars Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 4, S. 527.

Enzymbildung: In Mucor mucedo ist bis jetzt unter normalen Verhältnissen keine Amylase nachgewiesen worden. Verf.[2]) konnte nach längeren Versuchen, Amylasebildung hervorzurufen, dieses Ziel durch symbiotische Kultur mit einer Hefe erreichen, worauf eine weitere Anreicherung der Amylase durch Züchtung in Stärkelösungen gelang.

Hefen.

Besonders bemerkenswert ist, dass die Hefe das Glykogen ihrer eigenen Zellen spaltet[3]). Das Enzym, oft „Glykogenase" genannt, tritt aber nach aussen hin weder gegen Glykogen noch gegen Stärke in Wirksamkeit, solange die Zellen leben[4]). Im Presssaft wird Glykogen schnell gespalten, wie Cremer[5]) nachgewiesen hat. Auch wenn die Hefezellen autolysiert werden tritt das Enzym in Wirksamkeit; nach Harden und Paine[6]) in hohem Grade unter der Einwirkung plasmolysierender Salzlösungen. Trockenhefe scheint dagegen wenig wirksam zu sein, was auffallen muss, da die Durchlässigkeit der Zellmembran durch das Trocknen bedeutend erhöht wird. Im Kapitel

[1]) Weitere Einzelheiten siehe bei Kozai, Zbt. Bakt. II, 6, 385; 1900. — Über Saccharomyzeten aus Sakéhefe: R. Nakazawa ebenda 22. 529; 1909.

[2]) Euler, Zs f. Elektrochem. 24, 173; 1918.

[3]) In Saccharomyces apiculates fand Henneberg (Zs Spir. Ind. 25, 378 und 553; 1902) keine Amylase bzw. „Glykogenase".

[4]) A. Koch und Hosaeus, Zbt. Bakt. 16, 145; 1894.

[5]) Cremer, Zs Biol. 31, 183; 1894 und 32, 1; 1895.

[6]) Harden und Paine, Proc. Roy. Soc. Bd. 84, 448; 1912.

über alkoholische Gärung werden wir gelegentlich der Selbstgärung auf diese noch nicht geklärten Verhältnisse zurückkommen.

Dextrine (höhere Amylosen) werden von zahlreichen Hefen vergoren und dieser Vergärung geht nach Brown und Morris eine hydrolytische Spaltung voraus. Die Fähigkeit der Hefen zur Dextrinvergärung würde darnach durch ihren Gehalt an „Dextrinasen" (also etwa Okto- und Tetraamylasen) bestimmt sein. Lindner[1]) hat zahlreiche Hefen hinsichtlich der Dextrinvergärung untersucht. Für seine 4 Hefetypen, Pombe, Logos, Saaz und Frohberg ist offenbar die Fähigkeit zur Dextrinspaltung charakteristisch; Logos scheint „Achroodextrine" verhältnismässig gut zu vergären.

Grünalgen.

Über den Amylasegehalt und die Amylasebildung einiger Grünalgen, Ulothrix zonata, Cladophora glomerata, Cladophora fracta und Spirogyra hat K. Sjöberg[2]) eingehende Versuche angestellt.

Das Wirkungsoptimum lag bei $pH = 4—5$.

Die Bildung des stärkespaltenden Enzyms (untersucht nach Wohlgemuth) wird durch Stärkegehalt der Nährlösung gefördert, durch Zuckergehalt vermindert. Chloroform erhöht die Amylasewirkung von Algenpräparaten. Sehr bemerkenswert ist die Steigerung der Amylasewirkung durch 3stündige Behandlung der Algen mit 96%igem Alkohol.

Das Sonnenlicht hat auf die Bildung von Amylase in den Algen unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen keinen Einfluss. Die Algen bilden schon nach einigen Stunden in der Sonne deutlich Stärke, die Enzymwirkung zeigte aber keine Veränderung.

Bakterien.

Das Verhältnis der Fähigkeit zur Verflüssigung, Depolymerisation und Verzuckerung der Stärke ist bei verschiedenen Bakterien verschieden, was auch den bei anderen Mikroorganismen gewonnenen Ergebnissen entspricht. Was die Bakterienarten betrifft, in welchen Amylasen gefunden worden sind, so muss auf die Zusammenstellungen von Fuhrmann[3]), von Kruse[4]) und von Fermi[5]) verwiesen werden.

Die Eigenschaften von diastatischen Bakterien-Enzymen sind bis jetzt sehr wenig untersucht, auch sind diese noch selten isoliert worden. Eine Untersuchung von Avery und Glenn Cullen[6]) an Pneumokokken ergab als Aziditätsoptimum einen pH-Wert von etwa 7.

[1]) Lindner, Woch. f. Brau. 17, 713; 1900.
[2]) K. Sjöberg, Fermentf. 4, 97; 1920.
[3]) Fuhrmann, Die Bakterienenzyme. Jena 1907.
[4]) Kruse, Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910.
[5]) Fermi, Zbt. Bakt. II, 12, 1904. — Arch. f. Hyg. 10, 1; 1890.
[6]) Avery und Glenn Cullen, Jl of exp. med 32, 583; 1920.

Besondere Erwähnung verdient der von Schardinger isolierte und untersuchte

Bacillus macerans.

Morphologie[1]: Im Schwärmerstadium stellt der Bazillus schlanke, lebhaft bewegliche Stäbchen dar; Länge 4—6 μ und darüber, Dicke 0,8—1 μ; auf sauren Nährsubstraten werden die Stäbchen länger.

Im Stadium der Sporenbildung und Reifung werden die Stäbchen unbeweglich; nach vollzogener Sporenbildung schwindet das Stäbchen vollständig. Die reifen freien Sporen sind oval $\lambda = 2\ \mu$, $\delta = 1{,}5$—$1{,}8\ \mu$. Die Sporen sind gegenüber der Temperatur kochenden Wassers sehr widerstandsfähig.

Biologie: Wachstum auf den gebräuchlichen (nicht sauren) Nährböden zwischen 15—40°. Kultur nach Schardinger auf Kartoffelkeilen bei 37—40° oder auf Zwetschgenbrei[2]) oder auf Maisnährböden unter Zusatz von Hefenextrakt[3]). Durch Zusatz von Hefenwasser oder Extrakt von Malzkeimen zur Nährlösung werden besonders kräftige Kulturen erzielt.

Das Aziditätsoptimum des Zellenzuwachses von B. macerans liegt nach Euler und Svanberg (1922) bei pH = 6,5—7,0.

Der Bazillus, welcher zunächst dadurch erhebliches Interesse erweckt hat, dass er die Fähigkeit besitzt, Kohlehydrate unter Bildung von Azeton zu vergären, bildet, wie sein Entdecker 1909 fand[4]), aus Stärke kristallisierte Kohlehydrate, die von Schardinger und später eingehender von Pringsheim studierten Amylosen (vgl. S. 84).

Offenbar enthält dieser Mikroorganismus verhältnismässig wenig niedrigere Amylasen, dagegen viel Poly-Amylasen, und ist daher zum Studium der letzteren besonders geeignet.

Technische Anwendungen.

Diastatische Präparate werden teils für die Nahrungsmittelindustrie, besonders die Bäckereien, teils für die Textilindustrie gebraucht. Als „Malzmehl" wird gemahlenes Darrmalz bezeichnet; es wird besonders aus Gerstenmalz hergestellt. Die verbreitetsten Handelspräparate sind Diamalt und Diastafor, Präparate der Diamalt-Gesellschaft, München und Taka-Diastase bzw. ein Präparat des Takamine-Laboratoriums in Clifton, N. Y., Polyzime, das ohne Alkohol hergestellt ist. Herstellung von Malzextrakten aus Malzschrot für die Bäckerei nach D. R. P. 148844. Durch Verwendung solcher Backhilfsmittel kann Hefe gespart werden.

Diamalt ist ein sirupartiger Malzextrakt, welcher Dextrine und Maltose enthält und diastatisch stark wirksam ist.

In der Textilindustrie wird Diastafor verwendet sowohl zur Herstellung von Appretur und Schlichtemassen aus Stärke, als zum Entschlichten. Zusätze von Diastafor zu Bleichlösungen nach D. R. P. Kl. 8, 279993; (1914).

---

[1]) Schardinger, Wien. klin. Wochenschr. 17, Nr. 8, 1904. — Zbt. Bakt. II, 14, 772; 1905.

[2]) Schardinger, Zbt. Bakt. II, 19, 161; 1907.

[3]) Farbenfabr. Fr. Bayer u. Co., Elberfeld, D. R. P. 291162.

[4]) Schardinger, Zbt. Bakt. II, 22, 98; 1909.

Taka-Diastase findet in Ostasien zur Herstellung von Nahrungs- und Genussmitteln Verwendung (vgl. S. 130), Polyzime besonders in der amerikanischen Textilindustrie.

C. Methoden zur Messung der Stärkespaltung.

Unter den zahlreichen quantitativen Methoden, welche vorgeschlagen worden sind, um den Verlauf der enzymatischen Stärkespaltung und damit die Wirkung enzymatischen Materials zu ermitteln, können wir zwei Gruppen unterscheiden: Durch die eine werden Konzentrations- und Eigenschaftsänderungen der Stärke verfolgt, durch die andere werden die entstehenden Reaktionsprodukte gemessen.

1. Methoden zur Konzentrations- und Eigenschaftsbestimmung der Stärke.

Bei der Anwendung dieser Methoden muss vor allem beobachtet werden, dass die Stärke kein einheitliches Material darstellt und dass sie in kolloider Form zur Anwendung kommt. Der Zustand der stärkehaltigen Flüssigkeit ist also nicht durch die Konzentration allein definiert, sondern besonders auch durch den Dispersitätsgrad.

Das Substrat kommt in zwei verschiedenen Formen zur Verwendung:

1a) als Stärkekleister zur Bestimmung der Verflüssigung,

1b) als „lösliche Stärke" zur Messung des Abbaues der Stärke.

1a) Verflüssigung der Stärke.

Soll die Verflüssigung der Stärke gemessen werden, um die Wirksamkeit von Amylase-(Diastase-)-Präparaten zu bestimmen, so darf nicht übersehen werden, dass verflüssigende und verzuckernde Wirkung der Diastasen zwar oft miteinander einigermassen parallel gehen, dass aber diese beiden Vorgänge nicht quantitativ miteinander verknüpft sind und dass also die Verflüssigung nicht ohne weiteres als ein Mass für die Verzuckerung angesehen werden darf (vgl. S. 123).

Glinski und Walther[1]) haben die Mettsche Methode auch zur Diastasebestimmung angewandt. Enge, beiderseits offene Glasröhrchen werden mit Stärkekleister gefüllt und nach dessen Erstarren in die enzymhaltige Flüssigkeit gelegt. Nach einer gewissen Zeit misst man die Länge des gelösten Stärkezylinders. Die Geschwindigkeit des Vorganges hängt offenbar stark ab von der Diffusion des Enzyms zur freien Oberfläche des Stärkezylinders, sowie von der Geschwindigkeit, mit welcher sich die Reaktionsprodukte von der Oberfläche entfernen; die Bewegung der Flüssigkeit, bzw. der Röhren in der Flüssigkeit ist deswegen von grösstem Einfluss. Zu wissenschaftlichen Zwecken ist die Methode nicht genau genug und wird überhaupt nur in besonderen Fällen zur Anwendung gelangen.

Das gleiche gilt wohl von der Methode von Ed. Müller (Zbl. inn. Med. 1908), welcher statt der Röhrchen Platten von Stärkekleister benutzt.

Von älteren Verflüssigungsmethoden sind ferner noch diejenigen von Pollak[2]) und von

[1]) Siehe Pawlow, Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1898.

[2]) Pollak, Wochenschr. f. Brau. 1903, 595 und Zeitschr. f. Nahr.- u. Genussm. 6, 729; 1903.

Chrzaszcz[1]) zu erwähnen. Die Genauigkeit dieser Methoden ist natürlich gering, da es schwer ist, den Zeitpunkt der „vollständigen Verflüssigung" anzugeben.

Die eigentliche Verflüssigung, bzw. der Übergang des Substrates aus dem Gelzustande oder einem sehr hochviskösen Zustand zu einer Lösung von bedeutend geringerer innerer Reibung kann nur nach einer der in der Physik gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung der inneren Reibung geschehen.

Während sich für dünnflüssige Lösungen die Methode der Ausflussgeschwindigkeit aus kapillaren Röhren eingebürgert hat und wegen ihrer Einfachheit und Genauigkeit auch durchaus zu empfehlen ist, versagt dieselbe für dickflüssige Lösungen. Es muss dann eine Dämpfungsmethode, wie sie z. B. von Ladenburg[2]) beschrieben worden ist, oder die Methode fallender Körper, die sich auf die Berechnungen von G G. Stokes gründet, herangezogen werden. Letztere Methode hat neuerdings Urban Olsson für vorliegenden Fall sehr zweckmässig ausgearbeitet (vgl. S. 124).

Eine etwa 2%ige Emulsion von Kartoffelstärke wird durch Kochen verkleistert; die auf die Versuchstemperatur vorgewärmte Flüssigkeit wird mit der erforderlichen Pufferlösung und der Enzymlösung versetzt und zugleich mit einer in der Mischung befindlichen hohlen Glaskugel von 6 mm Durchmesser in das Versuchsrohr eingefüllt, das 35 cm lang ist und einen inneren Durchmesser von 1,7 cm besitzt. Unmittelbar hierauf wird das Rohr durch einen Gummistopfen verschlossen; zur Entfernung aller Luftblasen dient ein in den Stopfen eingesetztes Glasrohr, welches durch Gummischlauch und Quetschhahn verschliessbar ist. Die so vorbereitete Röhre wird in einen Thermostaten gebracht, in welchem sie um eine zur Längsrichtung senkrecht stehende Achse gedreht werden kann. Nach einer Umdrehung der vertikal stehenden Röhre um 180° wird das Aufsteigen der hohlen Glaskugel, welche spezifisch leichter als die Flüssigkeit ist, beobachtet, was durch die Fenster des Thermostaten leicht geschehen kann. Mittels eines Chronographen mit zwei Zeigern wird die Zeit gemessen, welche die Kugel zum Aufsteigen (zwischen zwei Marken) braucht. Indem man durch wiederholte Messungen die Abnahme dieser Aufsteigedauer feststellt, erhält man ein Mass für die fortschreitende Verflüssigung (Abnahme der inneren Reibung).

Eine Änderung der Aufsteigezeit von 3 Minuten entspricht einer Viskositätsänderung von 1,05 auf 1,01.

1b) Methoden zur Verfolgung des Abbaues der Stärke.

Von den chemischen Eigenschaften der Stärke, welche sich zur Messung eignen, kommt in erster Linie ihre Aufnahmefähigkeit für Jod bzw. die Bildung der blauen Jodstärke in Betracht; auf dieses Prinzip sind auch zahl-

[1]) Chrzaszcz und Pierozek, Zs f. Spir.-Ind. 33, 66; 1910.

[2]) Ladenburg hat eine sehr gute kritische Darstellung dieser Methoden gegeben. Ann. d. Phys. 22, 287; 1907.

reiche Messmethoden gegründet worden. Die ersten sind wohl von Roberts[1]) und Detmer angegeben, spätere von Takamine[2]) und von Francis, sowie in neuerer Zeit von Wohlgemuth[3]) und von Johnson.

Wohlgemuths Methode hat besonders zahlreiche medizinische Anwendungen gefunden. Sie hat — wie auch das Verfahren von Johnson — den Vorzug der Einfachheit, wenn auch in Fällen, in welchen es auf die Genauigkeit der Resultate ankommt, eine Verzuckerungsmethode vorzuziehen ist und wenigstens als Kontrolle empfohlen sei.

Man beschickt eine Reihe Reagensgläser mit absteigenden Mengen der zu untersuchenden Enzymlösung, fügt zu jedem Röhrchen 5 ccm einer 1⁰/₀igen Stärkelösung und stellt sofort jedes Röhrchen in ein Gefäss mit Eiswasser, in dem sich ein Drahtkorb zur Aufnahme der Gläschen befindet. Die Anwendung des Eiswassers hat den Zweck, jede Enzymwirkung zunächst vollständig auszuschliessen. Wenn dann alle Gläschen in dieser Weise vorbereitet sind, wird der Drahtkorb mit sämtlichen Gläschen in ein Wasserbad von 40^0 übertragen; dadurch wird erreicht, dass die Wirkung des Enzyms in allen Portionen zu genau dem gleichen Zeitpunkt einsetzt. Bei dieser Temperatur bleibt der Drahtkorb 30 bis 60 Minuten, je nachdem man den Versuch ausdehnen will, und wird nach Ablauf der entsprechenden Frist wieder in das Gefäss mit Eiswasser übertragen und kurze Zeit darin belassen; auf diese Weise wird die Enzymwirkung wiederum in sämtlichen Portionen zu genau der gleichen Zeit unterbrochen. Damit ist die eigentliche Ausführung des Versuches beendet.

Um nun die Stärke der Enzymlösung festzustellen, wird folgendermassen verfahren:

Sämtliche Reagensgläschen werden etwa bis fingerbreit vom Rande mit Wasser aufgefüllt, zu jedem Gläschen je ein Tropfen einer 0,10 n. Jodlösung zugesetzt und umgeschüttelt. Dabei beobachtet man verschiedene Färbungen, wie dunkelblau, blauviolett, rotgelb und gelb. Diejenigen Gläschen, die eine gelbe bis rotgelbe Farbe aufweisen, enthalten — wenn wir von einem weiteren Abbau der Stärke zu Maltose resp. Traubenzucker absehen — nur noch Achroodextrin resp. Erythrodextrin, die blauviolett gefärbten enthalten ein Gemisch von Erythrodextrin einerseits und Stärke andererseits, und endlich die dunkelblau gefärbten vorwiegend unveränderte Stärke. Als unterste Grenze der Wirksamkeit (limes) bezeichnet Wohlgemuth dasjenige Gläschen, in dem zum ersten Male die blaue Farbe unverkennbar auftritt, das ist also dasjenige Gläschen, das die violette Farbe zeigt. Danach

---

[1]) Roberts, Jl Chem. Soc. 40, 1051; 1881. — Siehe auch Vernon, Jl Physiol. 27, 174; 1901.

[2]) Takamine, Jl Soc. Chem. Ind. 17, 118; 437; 1898.

[3]) Wohlgemuth, Biochem. Zs 9, 1; 1908. — Siehe auch Grundriss der Fermentmethoden. Berlin 1913.

ist in dem vorhergehenden Gläschen sämtliche Stärke mindestens zum Dextrin abgebaut. Aus ihm berechnet sich die Enzymmenge in der Weise, dass die Anzahl Kubikzentimeter einer 1%igen Stärkelösung bestimmt wird, die durch 1,0 ccm der Enzymlösung in der für den Versuch angewandten Zeit bis zum Dextrin total abgebaut wird.

Das eben farblos gewordene Gläschen enthalte beispielsweise 0,02 ccm Speichel; es wären dann 0,02 ccm Speichel imstande, innerhalb 30 Minuten 5 ccm 1%iger Stärkelösung in Dextrin umzuwandeln, mithin 1,0 ccm Speichel = 250 ccm 1%ige Stärkelösung. Die diastatische Kraft für 1 ccm der Enzymlösung bezeichnet Wohlgemuth mit D und gibt gleichzeitig Versuchszeit und Temperatur an (s. S. 141). Für das hier gewählte Beispiel würde sich also ergeben $D_{30'}^{40^\circ} = 250$. Berechnen wir den diastatischen Wert aus einem Versuch, bei dem das Gläschen Nr. 5 als untere Grenze angenommen wird und bei dem das Gläschen Nr. 4, das 0,0125 ccm Speichel enthält, rot gefärbt sei (vgl. die l. c. gegebene Farbenskala), so haben wir folgende rechnerische Überlegung zu machen:

0,0125 ccm bauen in 30′ 5 ccm 1%ige Stärkelösung ab
1,0000 ccm „ „ 30′ 400 ccm 1%ige „ „

Mithin $D_{30'}^{40^\circ} = 400$.

Michaelis und Pechstein[1]), welche die Ptyalinwirkung nach dem Prinzip der Wohlgemuthschen Methode untersuchten, unterbrachen die Reaktion durch Zusatz von 10 ccm einer sehr verdünnten, und zwar 0,001 n. Jodlösung. Sie betonen, dass die Farbenreaktion nur in schwach saurer Lösung angewandt werden darf, da im alkalischen Gebiet eine mehr oder minder schnelle Entfärbung der anfänglichen Jodfärbung eintritt.

Starkenstein[2]) hat darauf aufmerksam gemacht, dass bei der Untersuchung von Organbreien oder überhaupt beim Arbeiten mit Mischungen, welche inhomogen sind und aus welchen Eiweisskörper ausfallen, Fehler entstehen, indem sowohl Stärke als Enzym vom Eiweissniederschlag mitgerissen wird. Er schlägt deshalb vor, die Reagensröhren während der ganzen Dauer der Digestion durch einen Schüttelapparat in Bewegung zu halten.

Andere Jodmethoden. Statt den Zeitpunkt für das Verschwinden der blauen Jodreaktion zu bestimmen, schlagen Evans[3]) und Johnson[4]) vor, den Eintritt des Reaktionsstadiums zu ermitteln, in welchem Jod-Jodkalium überhaupt keine Farbenreaktion mehr hervorruft, also des sog. „achromischen Punktes".

Eine Anzahl Kolben werden mit je 50 ccm 2%iger Lösung von Kartoffelstärke beschickt. Von der zu untersuchenden, ev. geeignet verdünnten Enzymlösung verwendet man 1, 2, 3, 4, 5 und 6 ccm, ergänzt auf 6 ccm und setzt sie bei 40° zu der Stärkelösung. Nach 10 Minuten

[1]) Michaelis und Pechstein, Biochem. Zs 59, 77; 1914.
[2]) Starkenstein, Biochem. Zs 24, 191; 1910.
[3]) C. L. Evans, Jl of physiol. 44, 219; 1912.
[4]) Johnson, Jl Amer. Chem. Soc. 30, 798; 1908.

entnimmt man jeder der sechs Mischungen 5 Tropfen und versetzt sie mit Jod-Jodkaliumlösung (0,016 g J und 0,032 g JK per Liter), um zu ermitteln, welche Probe farblos bleibt. Durch einen zweiten Versuch werden dann die Konzentrationsgrenzen des Enzyms verengert.

Sherman, Kendall und Clark[1]) haben 1910 eine neuere Modifikation der Jodmethode in Vorschlag gebracht, die sich von den früheren durch Anwendung verdünnterer Stärkelösungen, und eines grösseren Volumens der Reaktionsmischung sowie durch die längere Reaktionsdauer unterscheidet. Zu 250 ccm einer 1%igen Stärkelösung wird das Enzym, gelöst in 20 ccm Wasser, zugesetzt; Temp. 40°; gemessen wird die Zeit bis zum Verschwinden der Jodreaktion. Diese Methode hat bei der Untersuchung der Takadiastase (nicht aber von Pankreatin) befriedigende Resultate geliefert.

Eine von Waksman[2]) bei der Untersuchung der Diastase aus Aspergillus Oryzae angewandte Methode gründet sich ebenfalls auf das Verschwinden der Stärke in der Lösung; es wird nämlich der Zeitpunkt festgestellt, bei welchem die Stärkelösung durchsichtig wird; dazu wurde Neutralrot verwendet, welches von der Stärke adsorbiert wird.

2. Methoden zur Bestimmung der gebildeten Maltose.

Auch hier muss hervorgehoben werden, dass viele Diastasepräparate neben Amylasen noch Maltase enthalten und demgemäss auch Glukose entstehen lassen. Die Menge derselben ist manchmal erheblich, besonders bei Versuchen mit Takadiastase[3]).

Die Bestimmung der Maltose geschieht fast durchweg in bekannter Weise durch Fehlingsche Lösung. Die einzelnen Methoden unterscheiden sich hauptsächlich

a) durch die Bedingungen, unter welchen die Verzuckerung ausgeführt wird,

b) durch die Dosierung des Enzymmaterials.

Was die Reaktionsbedingungen betrifft, so wird man immer beim Aziditäts- und Neutralsalz-Optimum des betreffenden Enzyms arbeiten. Es empfiehlt sich also, folgende Vorschriften hinsichtlich der Versuchslösung einzuhalten:

Tierische Amylasen: pH = 6,5
0,1 g NaCl in je 100 ccm Reaktionsmischung.

Malzamylasen: pH = 5
Kochsalzzusatz unnötig.

Hinsichtlich der zu wählenden Temperatur geht aus dem in den Abschnitten A und B Gesagten hervor, dass die Amylasen bei 37—40° unter optimalen Aziditätsbedingungen noch stabil sind. Die Temperaturen 37—40° sind also zur Prüfung der Amylasepräparate geeignet. Die Temperatur soll auf wenigstens $^1/_5$° genau gemessen, konstant gehalten und angegeben werden.

---

[1]) Sherman, Kendall und Clark, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 1082; 1910.

[2]) Waksman, Jl Amer. Chem. Soc. 42, 293; 1920.

[3]) Siehe hierzu Sherman und Punnet, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1877; 1916.

Würden die Amylasen als Katalysatoren den einfachen Reaktionsgesetzen folgen, so wären weitere Vorschriften über die Prüfungsbedingungen überflüssig; die Reaktionskoeffizienten $k = 1/t \log a/a-x$ wären dann der angewandten Enzymkonzentration proportional. Dies ist aber nicht der Fall und es muss deshalb die Dosierung des Enzymmaterials bei der Prüfung durch Übereinkommen festgestellt werden.

Man ermittelt gewöhnlich diejenige Menge Enzymmaterial oder Enzymlösung, welche erforderlich ist, um unter gewissen Bedingungen in 1 Stunde eine gewisse Menge Maltose zu erzeugen.

Unter den sehr zahlreichen Vorschriften führe ich hier zunächst diejenige von Sherman, Kendall und Clark (l. c. und zwar 1083) an:

4 Flaschen enthalten solche Volumina von Enzymlösungen als 0,2, 0,5, 0,8 und 1,0 mg Enzympräparat entspricht. Jede Flasche wird mit 100 ccm einer wohl gekochten 2%igen Lösung von Lintner-Stärke versetzt. (Bei Untersuchung tierischer Amylasen Zusatz von 300 mg NaCl per 100 ccm Mischung). Einwirkungsdauer 30 Minuten bei 40°. Hierauf wird die Reaktion durch Zusatz von 50 ccm Fehlingscher Lösung unterbrochen, worauf man die Flasche 15 Minuten im kochenden Wasserbad hält. Die Lösung wird nun rasch filtriert und das Cu_2O nach einer genauen Methode gemessen. Das Gewicht des Cu_2O soll 300 mg nicht übersteigen. Wegen der Reduktion durch die lösliche Stärke selbst ist ein Blindversuch notwendig.

Wie die Autoren richtig hervorhoben, ist die diastatische Wirkung nicht der Enzymmenge proportional. Deswegen geben sie in einer Tabelle (l. c. S. 1084) die Beziehung zwischen dem gefundenen Cu_2O und einer von ihnen aufgestellten Reaktionskonstante an.

Euler und Svanberg[1]) haben in ihrer vorläufigen Mitteilung die Reaktionskoeffizienten der Verzuckerung gemessen und zwar bezogen sich diese auf die 1. Reaktionsphase (vgl. S. 121). Zur Prüfung der Amylasewirkung kann in dieser Weise mit Stärkekonzentrationen von 0,72—2,8% gearbeitet werden und mit Enzymkonzentrationen, welche bei 37° und optimaler Azidität Reaktionskonstanten 0,004 bis 0,08 ergeben.

Die Maltose kann nach einer der bekannten Reduktionsmethoden bestimmt werden. Man findet über die sehr brauchbare Methode von Bertrand und die Methode von Bang am Schlusse dieses Bandes nähere Angaben.

Lintner[2]) hat zur brauereitechnischen Bestimmung der diastatischen Kraft von Malz eine früher viel befolgte Anweisung gegeben, welche später nach Versuchen von Chr. Wirth[3]) modifiziert wurde.

Man bereitet einen Malzauszug durch sechsstündige Extraktion von 25 g Malzschrot mit 500 ccm Wasser bei gewöhnlicher Temperatur. Von dem

---

[1]) Euler und Svanberg, H. 112, 193; 1920.

[2]) Lintner, Jl prakt. Chem. 34, 386; 1886.

[3]) Chr. Wirth, Zs ges. Brauwesen 31, 421; 1908.

klar filtrierten Extrakt werden bei Grünmalz 2, bei hellem Malz 4 und bei dunklem 8 ccm zu 100 ccm einer 2%igen, neutralen Stärkelösung in einem 150 ccm-Kolben zugegeben und ½ Stunde bei 20° stehen gelassen. Dann werden 10 ccm 0,10 norm. NaOH zugesetzt, der Kolben wird mit Wasser auf 150 ccm aufgefüllt; die Maltose wird hierauf durch einen titrimetrischen Vorversuch mit Fehlingscher Lösung und schliesslich nach einer der üblichen Reduktionsmethoden, z. B. nach Soxleth, Allihn, Bertrand oder Bang bestimmt. Die Tabellen von Wein sollen keine zuverlässigen Werte liefern.

Die diastatische Fähigkeit wird ausgedrückt durch die Anzahl g Maltose, welche von 100 g Malz geliefert werden.

Ähnliche analytische Vorschriften sind von Ling und neuerdings von Kokichi Oshima[1]) angegeben worden.

Eine Modifikation der Lintnerschen Methode (Kochen mit Fehlingscher Lösung, Zusatz von JK und H_2SO_4 und Titration mit Thiosulfat) hat auch Flohil vorgeschlagen (Jl Ind. a. Engin. Chem. 12, 690; 1920).

Nach der neuerdings von Windisch und Kolbach[2]) angegebenen Vorschrift werden 25 g feingeschrotetes Darrmalz (90% Mehl) bzw. 25 g feinzerquetschtes Grünmalz mit 500 ccm Wasser eine halbe Stunde bei 50° gemaischt, abgekühlt, auf 525 g aufgewogen und blank filtriert.

100 ccm einer 2%igen Lösung von löslicher Stärke „Kahlbaum" (man benutze stets das gleiche Präparat) werden in einem 200 ccm-Kolben mit 5 ccm geeignet verdünnten Malzauszuges versetzt: Nach Durchschütteln wird das Reaktionskölbchen eine halbe Stunde genau auf 20° gehalten. Dann wird durch 10 ccm 0,1 n · NaOH unterbrochen, mit H_2O auf 200 ccm aufgefüllt. Je 30 ccm werden zur Maltosebestimmung entnommen, welche nach Willstätter[3]) jodometrisch ausgeführt wird.

Glykogen-Methode.

Zur Prüfung diastatischer Präparate oder Flüssigkeiten wird man diese Methode kaum wählen; dagegen kann sie zur Anwendung kommen, wenn es sich besonders um die Verfolgung der Glykogenspaltung handelt.

Man verwendet dann etwa eine 5%ige Glykogenlösung, die man unter Zusatz von Toluol mit der Enzymlösung oder mit dem Organbrei versetzt. Von Zeit zu Zeit bestimmt man in der Mischung die Menge des unveränderten Glykogens nach Pflüger, und zwar entweder polarimetrisch oder durch Titration[4]). Bang[5]) hat eine Modifikation angegeben, in welcher ebenfalls das unveränderte Glykogen isoliert, mit HCl hydrolysiert und schliesslich als Glykose titrimetrisch bestimmt wird.

[1]) K. Oshima, Jl Ind. a. Engin. Chem. 12, 991; 1920.

[2]) Windisch und Kolbach, Woch. Brau. 38, 149; 1921.

[3]) Willstätter und Schudel, Chem. Ber. 51, 780; 1918.

[4]) Pflüger, Pflüg. Arch. 129, 374; 1909. — Siehe auch Schöndorf, Junkersdorf und Franke, ebenda 127, 274; 1909.

[5]) Bang, Festschr. f. Hammarsten. Wiesbaden 1906.

D. Definitionen und Einheiten der Enzymwirkungen.

Unter Hinweis auf das S. 123 u. 134 Gesagte wird hier davon ausgegangen, dass an der Reaktion Stärke → Maltose mehrere Enzyme beteiligt sind und es muss betont werden, dass die gegenwärtigen Methoden, nach welchen die einzelnen Reaktionsphasen nicht geschieden werden können, nur eine angenäherte und vorläufige Charakterisierung der Wirksamkeit diastatischer Enzympräparate gestatten.

Entsprechend den drei Gruppen von Messmethoden, welche im vorstehenden Abschnitt behandelt worden sind, lässt sich die Einheit der Wirksamkeit entweder auf die Verflüssigung von Stärkegelen beziehen, oder auf das Verschwinden der Stärke aus der Lösung oder endlich auf die Bildung der Maltose.

Misst man die enzymatische Stärkespaltung nach der Wohlgemuthschen Jodmethode, so wird man auch seinem Vorschlag hinsichtlich der Angabe der Wirkungseinheit folgen. Nach Wohlgemuth soll diejenige Anzahl ccm einer 1%igen Stärkelösung ermittelt werden, welche durch 1 ccm der zu untersuchenden Enzymlösung innerhalb der gewählten Versuchsdauer (30 Minuten oder 24 Stunden) bis zum Dextrin abgebaut werden.

Die diastatische Wirkung für 1 ccm der Enzymlösung bezeichnet Wohlgemuth in Abkürzung des Wortes Diastase mit D und gibt durch Indexe Temperatur und Zeit an, mit denen gearbeitet wurde. Also bedeutet:

$$D^{40^\circ}_{30'} = 250,$$

dass 1 ccm der untersuchten Enzymlösung imstande ist, bei 40° in 30 Minuten 250 ccm 1%ige Stärkelösung abzubauen.

Für den Enzymgehalt wird hierdurch natürlich nur insoweit ein richtiges Mass erzielt, als Enzymmenge und Enzymwirkung proportional sind.

Speichel sowie andere Sekrete und Körperflüssigkeiten lassen sich in gleicher Weise messen wie Enzymlösungen. Von Organen werden Extrakte oder Presssäfte hergestellt. Herstellung und Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung. Spezialvorschläge für Arbeiten mit Organen findet man in der zitierten Monographie von Wohlgemuth, S. 57 u. ff.

Wie schon erwähnt, wird zu technischen Zwecken vielfach noch die Lintnersche Methode angewandt (vgl. S. 139). Die Wirksamkeit diastatischen Materials wird nach Lintner in der Weise angegeben, dass man angibt, wieviel Enzymlösung resp. Malzextrakt erforderlich ist, um in einer bestimmten Zeit (gewöhnlich ½ Stunde oder 1 Stunde) aus einer 2%igen Stärkelösung so viel Zucker abzuspalten, dass 5 ccm Fehlings-Lösung gerade reduziert werden.

Analog geschieht die Berechnung nach Ling. Hat man z. B. 100 ccm einer 2%igen Stärke mit 1,5 ccm Malzextrakt gemischt und die auf 200 ccm verdünnte Lösung 1 Stunde bei 21° stehen lassen. Werden dann 25 ccm

dieser Lösung benötigt, um 5 ccm Fehlingsche Lösung zu reduzieren, so ist die diastatische Fähigkeit

$$\frac{1000}{25\ 1{,}5} = 26{,}7.$$

Eine neue Einheit hat Sherman[1]) eingeführt und angewandt. Er arbeitet immer mit 2 g Stärke und schlägt vor, immer 30 Minuten lang bei 40° zu verzuckern. Sherman, Kendall und Clark geben folgende Tabelle an, aus welcher zunächst die Beziehung zwischen der gebildeten Menge Cu_2O und einer Reaktionskonstanten K entnommen werden kann. Aus den K-Werten der Tabelle ergeben sich die Einheiten der Shermanschen „new scale" durch Division mit der Enzymmenge. Wir geben die Shermansche Tabelle hier wieder:

Cu_2O mg	K	Cu_2O mg	K	Cu_2O mg	K	Cu_2O mg	K
30	9,1	100	31,2	170	54,1	240	78,2
40	12,2	110	34,4	180	57,5	250	81,8
50	15,3	120	37,6	190	60,9	260	85,4
60	18,4	130	40,9	200	64,3	270	89,0
70	21,6	140	44,2	210	67,8	280	92,6
80	24,8	150	47,5	220	71,3	290	96,3
90	28,0	160	50,8	230	74,8	300	100,0

Zur Umrechnung dienen folgende Zahlen (vorausgesetzt 0,0312 g Enzym):

Cu_2O	Cu	mg Maltose	K	„new scale"
30	26,8	24,2	9,1	—
60	53,5	48,6	18,4	—
100	89,4	82,0	13,2	1000

Schliesslich haben Euler und Svanberg[2]) die Wirkungsfähigkeit ihrer Präparate in einer Weise angegeben, welche sich der früher für Saccharasepräparate benutzten anschliesst.

Bezeichnen wir mit k die monomolekulare Verzuckerungskonstante, mit welcher sich der erste, grösste Teil der Verzuckerung vollzieht, mit „g Maltose" die Anzahl g Maltose, welche bei der durch k gemessenen Reaktion gewonnen werden kann, und mit „g Präparat" die Menge Enzympräparat, welche im Gesamtvolum der Reaktionsflüssigkeit gelöst wurde, so erhalten wir folgenden Ausdruck für die Wirkungsfähigkeit eines Diastasepräparates hinsichtlich der Maltosebildung

$$\text{Verzuckerungsfähigkeit pro g Trockengewicht, } Sf = \frac{k \cdot \text{g Maltose}}{\text{g Präparat}}.$$

[1]) Sherman, Kendall und Clark, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 1073; 1910.

[2]) Euler und Svanberg, H. 112, 193; 1920.

Die Genauigkeit und Brauchbarkeit dieser Definition des Amylasegehaltes geht hervor aus der Konstanz der in der letzten Spalte der folgenden Tabelle angegebenen Werte Sf, welche aus verschiedenen Versuchen gewonnen worden sind; sämtliche Werte gelten für die Temperatur 37° und für pH-Optimum.

Stärke g	Maltose g	Enzymlösung ccm	Trockengewicht der Enzymlösung g	Mittel k	Sf
0,5	0,375	1	0,00077	0,024	11,7
0,5	0,375	2	0,00154	0,045	10,9
0,5	0,375	1	0,00077	0,022	10,7
0,5	0,375	0,5	0,000385	0,011	10,7
0,5	0,375	0,2	0,000154	0,0040	9,75
1,0	0,75	1	0,00077	0,0115	11,2
0,25	0,1875	1	0,00077	0,044	10,7

Der Mittelwert von Sf beträgt 10,8 für das untersuchte Präparat, der mittlere Fehler in einer Bestimmung ist 0,7, also 6% vom Totalwert.

Der so gewonnene Zahlenwert für Sf ist — solange das Substrat nicht genauer definiert und die Grenze der monomolekularen Verzuckerung nur empirisch festgestellt ist — ein vorläufiger. Er wird sich jedoch bei später gewonnener genauerer Kenntnis über die Amylose und ihre Spaltung ohne Schwierigkeiten umrechnen lassen.

Mit der Konstanten k geht natürlich die Spaltbarkeit der angewandten Stärke in den Wert Sf ein. Diese Spaltbarkeit ist nicht für alle Stärkepräparate gleich (siehe hiezu Euler und Svanberg l. c. S. 221).

Der Bereich, in welchem die Wirkungsfähigkeit eines Amylasepräparates durch den Wert Sf genau ausgedrückt wird, liegt zunächst zwischen den Substratkonzentrationen 0,25 und 1,0 g Stärke pro 36 ccm, also zwischen Stärkekonzentrationen 0,72 und 2,8% und zwischen Enzymkonzentrationen, welche bei 37°, optimaler Azidität und Anwesenheit eines geeigneten Neutralsalzes die Reaktionskonstanten 0,004 bis 0,08 ergeben.

Die Umrechnung der Einheit Sf ergibt sich aus folgender Tabelle:

Minuten	Maltose mg	a—x	k
30	82	1418	0,00080
—	1500	—	—

$$Sf = \frac{0{,}0008 \cdot 1{,}5}{0{,}0000312} = 38{,}5.$$

Demgemäss entsprechen 1000 Einheiten „new scale“ einem Wert Sf = 38,5.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass Sherman und Schlesinger ein hochaktives Amylasepräparat dargestellt haben, dessen

Wirksamkeit sie zu 1500 Einheiten der „new scale“ angeben. Dieses Präparat hat also, in der hier vorgeschlagenen Einheit ausgedrückt, die Wirkungsfähigkeit Sf = 58.

Die vorstehenden Angaben sind dann noch auf eine einheitliche Temperatur zu reduzieren; die Temperaturkoeffizienten sind für tierische und pflanzliche Enzyme verschieden, man findet sie S. 103 und 126.

Für die Umrechnung der Lintnerschen Skala in Sf geht man davon aus, dass 5 ccm Fehlingsche Lösung 0,3682 g Maltose entsprechen (vgl. Wirth, Dissertation l. c.); man kann dann k aus folgender Überschlagsrechnung ermitteln:

Minuten		a — x	
60	36,82	113,18	0,00205
150	150		

Hieraus berechnet man $Sf = \frac{0{,}00205 \cdot 0{,}150}{0{,}00012} = 2{,}55.$

1000 Lintner-Einheiten F entsprechen also rund 26 Sf.

Eine Umrechnung der Wohlgemuth-Einheit in Sf hat wenig Wert, da sich diese Einheiten auf 2 verschiedene Reaktionen resp. Enzyme beziehen.

Zeitwert: In manchen Fällen wird es genügen, die Wirksamkeit von diastasehaltigem Material dadurch auszudrücken, dass man die Zeit in Minuten angibt, in welcher 1 g Präparat unter oben erwähnten Normalbedingungen (37°, opt. Azidität und opt. NaCl-Gehalt) 2 g Stärke in 100 ccm zur Hälfte in Maltose spaltet.

Nachtrag zur neuen Literatur: Lüers und Wasmund, Fermentf. 5; 1922.

5. Kapitel.

α-Hexosidasen.

Unter Hexosiden werden im folgenden ätherartige Verbindungen der Hexosen verstanden, und zwar sowohl solche vom Typus der Methylglukoside oder der Phenylglukoside, als auch solche vom Typus der Maltose, also sog. Disaccharide oder Biosen. Zu den Hexosiden sind in erster Linie die Glukoside zu rechnen, ferner auch die Fruktoside und Galaktoside usw.

Nach Emil Fischer bestehen zwei Reihen von Hexosiden, die sog. α-Hexoside und β-Hexoside, charakterisiert einerseits durch die Zugehörigkeit der in ihnen enthaltenen Hexosen zur α- bzw. β-Reihe, andererseits durch ihr Verhalten zu zwei verschiedenen Enzymgruppen, welche demgemäss als α- und β-Hexosidasen zu bezeichnen sind. Die Einteilung in eine α- und β-Gruppe wird hier einstweilen beibehalten, obwohl die tatsächlichen Grundlagen derselben nicht ganz feststehen.

Wir können bis jetzt zwei Gruppen unter den α-Hexosidasen unterscheiden, nämlich

α-Glukosidasen und α-Fruktosidasen

und werden dieser Einteilung folgen.

A. α-Glukosidasen.

E. Fischer[1]) nahm an, „dass ein- und dasselbe Enzym der Hefe, die Maltase, sowohl die Methylglukoside als auch die Melibiose und verschiedene als Dextrine bezeichnete, kompliziertere Kohlehydrate angreifen kann". Indessen hatte Fischer selbst mit Niebel[2]) gefunden, dass Pferde- und Rinderserum, welche die Maltose leicht spalten, α-Methylglukosid gar nicht angreifen. Was Fischer als Annahme ausgesprochen hatte, wurde später oft als sicher bezeichnet. Rona und Michaelis[3]) haben die Unsicherheit dieser Annahme wieder betont, konnten aber aus ihren eigenen Versuchen einen sicheren Schluss nicht ziehen. Erst neuerdings hat Willstätter in einer eingehenden Untersuchung[4]) wichtige Gründe für die Annahme einer

[1]) E. Fischer, H. 26, 60; 1898.

[2]) E. Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. 5, 73; 1896.

[3]) Rona und Michaelis, Biochem. Zs 57, 70; 1913 und 58, 148; 1913. — Siehe auch H. E. Armstrong und E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. 79, 360; 1907.

[4]) Willstätter und Steibelt, H. 115, 199; 1921.

von Maltase verschiedenen α-Methylglukosidase beigebracht. Dass Maltase und α Methylglukosidase zwei verschiedene Enzyme sind, wird dadurch wahrscheinlich, dass die enzymatischen Wirkungen der Hefe auf die Substrate, ausgedrückt durch die Zeitwerte der Hefe für Maltase und Methylglukosidase, kein konstantes Verhältnis aufweisen[1]. Den Quotienten

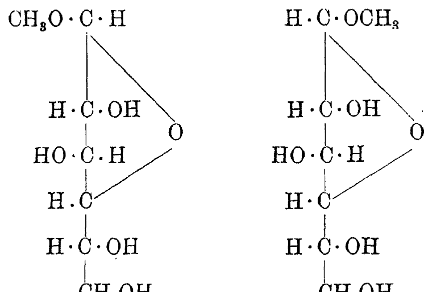
$$\frac{\text{Zeitwert für } \alpha\text{-Glukosidase}}{\text{Zeitwert für Maltase}}$$

finden Willstätter und Steibelt (l. c.) beispielsweise bei verschiedenen Brauereihefen zwischen 7,7 und 0,9 schwankend, noch tiefer fällt er bei Brauereihefe. „Auch bei einer einzigen Hefeprobe ist dieses Verhältnis leicht veränderlich."

„Aus der Verschiedenheit der Maltose und α-Glukosid spaltenden Enzyme ist zu folgern, dass die Hefe für die Hydrolyse zusammengesetzter Zucker eine grössere Zahl besonderer Enzyme ausbildet, als man bisher annahm."

1. α-Methylglukosidase.

Substrat: Den beiden, von E. Fischer 1893 entdeckten Methylglukosiden schreibt man nunmehr ziemlich allgemein die folgenden Formeln zu:



α- und β-Methylglukosid.

Das α-Methylglukosid, Schmelzpunkt 165°, zeigt eine spezifische Drehung $[\alpha]_D = +157^0$, während die β-Verbindung links dreht. Beide Isomere werden durch verdünnte Säuren hydrolysiert, und zwar das α-Glukosid etwas langsamer als das β-Glukosid. Zwischen den beiden Formen stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein bei 77 % des α-Glukosides und 23 % des β-Glukosides.

Wie wohl zuerst von Simon[2] vermutet wurde, entspricht die Isomerie zwischen dem α- und β-Methylglukosid derjenigen zwischen den beiden Tanretschen Glukoseformen:

[1]) Allerdings ist nicht ganz ausgeschlossen, dass Aktivatoren existieren, welche auf das eine oder andere Substrat spezifisch wirken.

[2]) L. J. Simon, C. r. 132, 487 und 596; 1901. — Siehe auch Tanret, Bull. Soc. Chim. (3) 33, 337; 1905.

α-Methylglukosid $[\alpha]_D = +157^0$		β-Methylglukosid $[\alpha]_D = -33^0$	
α-Glukose	$+110^0$	β-Glukose	$+19^0$.

Nach E. F. Armstrong[1]) wird bei der raschen enzymatischen Spaltung des α-Glukosides eine Glukose von hoher Anfangsdrehung erhalten, während β-Methylglukosid bei der Einwirkung von Emulsin eine Glukose von niedriger Anfangsdrehung liefert. Dadurch scheint eine experimentelle Stütze für die Annahme beigebracht, dass aus α-Glukosiden α-Glukose, aus β-Glukosiden β-Glukose abgespalten wird. Immerhin bedarf diese offenbar wichtige Beziehung noch einer eingehenden Prüfung.

Vorkommen: Wie S. 149 erwähnt wurde, sind die Verschiedenheiten von Methylglukosidase und Maltase erst 1921 von Willstätter und Steibelt beschrieben worden, und zwar beziehen sich ihre Befunde auf verschiedene Hefen. Wenn demgemäss also auch α Methylglykosidase erst in Hefen nachgewiesen worden ist, so begleitet doch wahrscheinlich das gleiche oder ein ähnliches Enzym die Maltase auch sonst im Pflanzenreich. Ob α-Methylglukosidase im Tierkörper häufig fehlt oder ob die Befunde von Fischer und Niebel Ausnahmen bilden, bleibt noch zu untersuchen.

Das Verhältnis der Maltase- und Glukosidasewirkung variiert bei verschiedenen Hefen recht stark, wie der folgende Auszug aus der Tabelle nach Willstätter und Steibelt (l. c. S. 206) zeigt, welcher die Quotienten der Zeitwerte (vgl. S. 148) angibt.

Hefe	Quotient der Zeitwerte	Hefe	Quotient der Zeitwerte
Löwenbräu	4,5	Weinhefe Assmannshäuser	Anfangswert 2,5
Hofbräu	3,4		Endwert 3,2
Spatenbräu	Anfangswert 0,9	Brennereihefe M	0,7
	Endwert 1,1	Brennereihefe, Rasse II	1,0
Pschorrbräu	Anfangswert 7,7	Brennereihefe, Rasse XII	Anfangswert 0,8
Frohberg, Unterh. Reink.	Anfangswert 5,5		Endwert 1,3
Weissbräu Tal	2,5	Brennereihefe, Kopenhagen	Anfangswert 1,8
			Endwert 1,1

Darstellung: Über die Isolierung des Enzyms ist bisher nichts bekannt geworden; erwähnenswert ist aber in diesem Zusammenhang das Ergebnis von Willstätter und Steibelt, dass die Glukosidase und die Maltase beim Ausziehen der Hefe nicht in gleichem Masse in Lösung gehen, also nicht mit demselben Quotienten der Zeitwerte in den Hefenextrakten wirken, wie in den Hefen selbst. Die Verschiebung kann auf ungleicher Beständigkeit der Enzyme beruhen, aber auch darauf, dass die Auflösung der kohlehydratspaltenden Enzyme kein einfacher Lösungsvorgang, sondern eine enzymatische Abspaltung ist.

[1]) E. F. Armstrong, Jl Chem. Soc. 83, 1305; 1903.

Einfluss der Azidität: Rona und Michaelis (l. c.) fanden die optimale Zone zwischen pH = 5,8 und 6,6, während für die Wirkung der gleichen Enzymlösungen auf Maltose die Zone 6,0 bis 6,6 angegeben worden war. Als besten Punkt für die Spaltung des Methylglukosides sahen die genannten Autoren pH = 6,2 an, als entsprechender Punkt für die Maltose konnte 6,6 gelten.

Willstätter und Steibelt liessen die Spaltung bei pH = 6,8 verlaufen, da sie weder für Maltase- noch Glukosidasewirkung zwischen 6,0 und 6,8 über die Fehlergrenze hinausgehende Unterschiede beobachten konnten.

Spaltung von Maltose und α-Methylglukosid bei pH = 6,0 bis 7,8.

pH Phosphatpuffer	Maltase		α Glukosidase	
	Maltosespaltung	Zeitwert des Hefeauszuges	Glukosidspaltung	Zeitwert des Hefeauszuges
6,0	43,0	86	32,7	142
6,4	42,8	87	33,3	137
6,8 }	42,7	87	32,7	142
6,8 }			28,2	280
7,2	41,4	93	24,5	340
7,8	40,3	99	24,5	340

Auf beginnend alkalischem Gebiet erwies sich die Wirkung also abgeschwächt, aber weniger als in den Versuchen von Rona und Michaelis.

Das Aziditätsoptimum der synthetischen Wirkung scheint nach Versuchen von Bourquelot und Aubry[1]) mit demjenigen der Hydrolyse nahe übereinzustimmen. Dies ist von vornherein nicht notwendig; im Gegenteil könnten für Hydrolyse und Synthese verschiedene Aziditätsbedingungen gelten.

Kinetik. Bei Willstätter und Steibelt findet man eine Versuchsreihe, welche zeigt, dass für einen gewissen Umsatz das Produkt aus Enzymmenge und Zeitdauer konstant gefunden wird. Lösungsvolumen 50 ccm.

Rel. Enzymmenge	Zeit	Prozentische Spaltung
1	800	32,0
2	400	32,0
5	160	31,4
10	80	31,4

Die enzymatische Spaltung des α-Glukosides verläuft zeitlich ähnlich wie diejenige der Maltose, indem in beiden Fällen die Reaktionskonstante 1. Ordnung $k = 1/t \cdot \ln a/a-x$ mit fortschreitender Reaktion stark abnimmt; dies zeigt die Fig. 21.

Zeitwert. Willstätter gibt den Wirkungswert seines Materials in folgender Weise an: Es wird die Zeit in Minuten bestimmt, die 1 g trockene Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung braucht, um bei

[1]) Bourquelot und Aubry, C. r. 161, 184; 1915.

30° 1,347 g α-Methylglukosid (entsprechend 1,25 g abzuspaltender Glukose) zur Hälfte zu hydrolisieren, wenn diese in 50 ccm zusammen mit 60 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ und 45 mg KH_2PO_4 enthalten sind (also bei pH = 6,8).

Die zur halben Spaltung erforderliche Zeit ermittelt Willstätter aus Reaktionskurven wie die folgende: (30°, 2,694%ige Glukosidlösung).

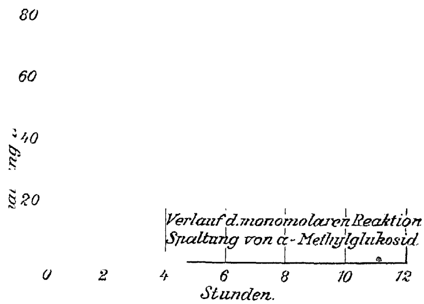


Fig. 21.

Minuten	Drehungsabnahme	Umsatz %
10	0,37	7,6
20	0,60	12,3
40	1,00	20 4
60	1,31	26,7
100	1,76	35,9
160	2.25	45,9
240	2,60	53,1
340	2,95	60,2

„Bei vielen Hefen von normalem Enzymgehalt entspricht der Verlauf der Glukosidspaltung der ermittelten Reaktionskurve. Bei Hefen, die auf α-Methylglukosid schwach wirken, ergibt sich der Zeitwert bei längerer Versuchsdauer günstiger als bei kurzer.“ Diese Erscheinung führt Willstätter auf Enzymzuwachs zurück, auf postmortale Neubildung des Enzyms im Laufe der langen Bestimmungsdauer. In solchen Fällen wird ein Zeitwert für den Bestimmungsanfang extrapoliert und ein zweiter für das Bestimmungsende ermittelt (vgl. z. B. Tabelle S. 147).

Rona und Michaelis haben ihre Messungen dazu benutzt, die Dissoziationskonstante der Verbindung Glukosid—Glukosidase zu berechnen, und zwar in der gleichen Weise wie Michaelis dies früher für die Dissoziationskonstante Rohrzucker—Saccharase getan hat. Man findet diese Berechnung im I. Teil dieses Buches, S. 111 ff. ausführlich referiert. Die Autoren geben folgenden Zahlenwert an:

$$\frac{[\text{Glukosidase — Glukosid}]}{[\text{Glukosidase}] \cdot [\text{Glukusid}]} = 0{,}090.$$

Enzymatische Synthese des α-Methylglukosides.

Im I. Teil dieses Buches ist bereits auf Bourquelots und seiner Mitarbeiter erfolgreiche Arbeiten hingewiesen worden, durch welche die enzymatischen Synthesen überhaupt am Beispiel der Methylglukoside wesentlich geklärt worden sind. Ein Versuch zur Darstellung von α-Methylglukosid ist bereits im I. Teil, S. 220, referiert worden, ebenso Bourquelots Untersuchung über die Lage des Gleichgewichts und dessen Abhängigkeit von der Konzentration der Komponenten.

Besonders bemerkenswert ist, dass eine identische Gleichgewichtslage von beiden Seiten her erreicht worden ist (l. c. S. 334).

	Drehung Anfang	Drehung Ende	Reduz. Zucker Ende
Hydrolyse . .	$+3^{0}24'$	$+2^{0}24'$	0,208
Synthese	$+1^{0}\ 4'$	$+2^{0}22'$	0,216.

Ich kann mich also unter Hinweis auf das früher Gesagte darauf beschränken, hier eine Vorschrift von Aubry[1]) anzuführen, welche sich für die Ausführung der enzymatischen Synthese in grösserem Massstab bewährt hat.

Zu 1800 g reinen Methylalkohols, der sich in einer 10-Literflasche befindet, fügt man 500 g Glukose, gelöst in 4 Liter dest. Wassers. Man schüttelt und setzt die vorher filtrierte Mazeration (3 Liter, enthaltend 10% getrocknete Unterhefe) zu, schüttelt von neuem und ergänzt das Gesamtvolumen auf 10 Liter.

Man lässt die Mischung bei Zimmertemperatnr stehen, bis die ursprüngliche Drehung $+5^{0}\,18'$ auf etwa $+11^{0}$ gestiegen ist. Die Isolierung und Reinigung des Glukusides geschieht nach den im Teil I, S. 224 erwähnten Angaben.

2. Andere α-Alkyl-Glukosidasen.

Das ebenfalls durch E. Fischer[2]) bekannt gewordene α-Äthylglukosid ist enzymatisch durch Bourquelot synthetisiert worden.

Ausserdem beschreibt Bourquelot mit seinen Mitarbeitern die Synthesen der α-Glukoside folgender einwertiger Alkoholradikale:

Propyl	Butyl
Allyl	Isobutyl.

Schliesslich wurde die biochemische Synthese von α-Monoglukosiden durchgeführt mit folgenden mehrwertigen Alkoholen[3]):

Glykol, Isopropylglykol, Glyzerin.

[1]) Bourquelot, Ann de Chim. (9), 111, 287, und zwar 317; 1915.

[2]) E. Fischer, Chem. Ber. 26, 2400; 1893. — Bezüglich der enzymatischen Spaltung siehe E. Fischer, Chem. Ber. 27, 2985; 1894.

[3]) Siehe Bourquelot, Bridel und Aubry, C. r. 161, 41; 1915 (Glyzerin). — Bourquelot, Ann. Chim. (9) 4, 310; 1915.

3. Glukose-α-Glukosidasen.

Maltase.

Den α-Alkylglukosidasen wird hier die Maltase angereiht. Es sei aber nochmals hervorgehoben, dass die genetischen Beziehungen dieser Diglukase zu den α-Alkylglukosidasen noch nicht feststehen.

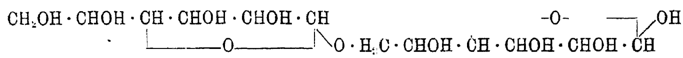
Substrat: Die Maltose kristallisiert mit 1 Mol. H_2O; die Zusammensetzung ist also $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$.

Drehung des Anhydrids: $[\alpha]_D^{20} = +137{,}2^0$; das Drehungsvermögen ist abhängig von der Konzentration und der Temperatur.

Für $p = 5-35$ und $t = 15-35^0$ gilt: $[\alpha]_D = 140{,}375 - 0{,}01837\,p - 0{,}095\,t$.

Drehung des Hydrates: $[\alpha]_D^{20} = 130{,}5^0$. Maltose zeigt Mutarotation und zwar steigt die Drehung der frisch hergestellten Lösung, was auf die Herstellung eines Gleichgewichts zwischen einer α-Form ($+114^0$) und einer β-Form zurückgeführt wird (Hudson[1]).

Nach den Ergebnissen neuerer Untersuchungen bringt die von Haworth und Leitch[2]) aufgestellte Formel die Eigenschaften der Maltose am besten zum Ausdruck:



Die sterischen Einzelheiten sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Maltose wurde von E. Fischer als Glukose-α-Glukosid aufgefasst, und zwar auf Grund der Zerlegbarkeit durch Hefen, welche das typische, α-d-Glukosid-spaltende Agenz enthalten.

Aus obiger, wie schon aus älteren Formeln erhellt, dass die Maltose eine Fehlingsche Lösung reduzierende Gruppe enthält und überhaupt die Eigenschaften einer Aldose zeigt.

Durch starke Säuren wird Maltose viel langsamer hydrolysiert als Rohrzucker, aber schneller als α-Methylglukosid. Die folgenden relativen Spaltungsgeschwindigkeiten sind nach E. F. Armstrong und Caldwell[3]) berechnet:

Methylglukosid	0,14
Maltose	1,00
Rohrzucker	9,8

Tierische Maltasen.

Vorkommen. Die meisten, wenn nicht alle tierischen Organe und Flüssigkeiten, welche Stärke spalten, enthalten auch Maltase; demgemäss geht der Abbau der Stärke teilweise bis zur Glukose. Der Umstand, dass der

[1]) Hudson, Jl Amer. Chem. Soc. 30, 1781; 1908.

[2]) Haworth und Leitch, Jl Chem. Soc. 115, 809; 1919.

[3]) E. F. Armstrong und Caldwell, Proc. Roy. Soc. B. 73, 526, 1904. — Siehe auch E. F. Armstrong, The simple Carbohydrates and the Glucosides. 3. Aufl. 1919. S. 130.

grösste Teil der Stärke als Maltose gefunden wird, zeigt aber, dass die Wirksamkeit und demgemäss vermutlich die Menge der Maltase in diesem Material im Vergleich zur Amylase gering ist.

Im Speichel und im Pankreassaft findet man nur schwache Maltasewirkung.

Im Darm wurde das Enzym von Bourquelot[1]), Shore und Tebb[2]), Hamburger[3]) und Röhmann[4]) nachgewiesen und näher untersucht. Nach letzterem soll es sich im Jejunum in höherem Grad finden als im Ileum, was mit den Befunden von Euler und Svanberg an Saccharase (siehe dort) in guter Übereinstimmung steht.

Lebermaltasen verschiedener Tiere haben Kusumoto[5]), Tebb und Doxiades[6]) untersucht.

Blutserum besitzt eine ziemlich starke Fähigkeit, Maltose zu spalten, wie aus den Arbeiten von Röhmann[7]), Bial[8]), Hamburger, Tebb und besonders von Fischer und Niebel[9]) hervorgeht.

Wirkungsbedingungen: Über das Aziditätsoptimum tierischer Maltasen ist, von einer Beobachtung von Doxiades abgesehen, nichts bekannt geworden. Man darf wohl annehmen, dass das Optimum nicht weit vom Aziditätspunkt des betreffenden Materials entfernt ist, also in der Nähe von pH = 7 liegt.

Maltase der Phanerogamen.

Im Malz findet man die diastatischen Enzyme meist von kleinen Mengen Maltase begleitet. Auch die übrigen amylasehaltigen Getreidearten dürften Maltase enthalten. Besonders nachgewiesen ist dies hinsichtlich Mais von Beyerinck[10]), welcher aus diesem Material ein Maltasepräparat dargestellt hat, ferner von Geduld[11]) und von Huerre[12]). Letzterer Forscher glaubte im Embryo des Maises zwei Maltasen nachgewiesen zu haben, welche sich durch ihre Löslichkeit und ihre Temperaturempfindlichkeit unterscheiden. Auch im Samen von Fagopyrum (Buchweizen) fand Huerre zwei ent-

1) Bourquelot, C. r. 97, 1000; 1883.
2) Shore und Tebb, Jl of Physiol. 13, (19); 1892. — Tebb, ebenda 15, 421; 1894.
3) Hamburger, Pflüg. Arch. 60, 575; 1895.
4) Röhmann, Chem. Ber. 27, 3252; 1894. — Röhmann und Nagano, Pflüg. Arch. 95, 533; 1903.
5) Kusumoto, Biochem. Zs 14, 217; 1908.
6) Doxiades, Biochem. Zs 32, 410; 1911.
7) Röhmann, Chem. Ber. 25, 3654; 1892.
8) Bial, Pflüg. Arch. 54, 72; 1893.
9) Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. 5, 73; 1896.
10) Beyerinck, Zbt. Bakt. II, 1, 221; 1895.
11) Geduld, Kochs Jahresber. 1891, 220.
12) Huerre, C. r. 148, 300; 1908.

sprechende Maltasen. Schon E. Fischer[1]) hatte angenommen, dass die Malzmaltase von der Maltase der Hefen verschieden ist.

Maltase der Kryptogamen.

Hefenmaltase.

Vorkommen. Die meisten Kulturhefen enthalten Maltase, aber sehr verschiedene Mengen. Als maltasefrei werden angegeben:

Saccharomyces Marxianus nach den Befunden von E. Chr. Hansen sowie E. Fischer und Lindner[2]); sowie S. exignus (Hansen).

Saccharomyces apiculatus, Pseudosacch. apiculatus (Klöcker).

Ferner spalten nicht: S. Ludwigii, Willia anomala (Hansen) u. a.

Von Monilia candida wird Maltose nach Fischer[3]) gespalten.

Mit einem Hefenextrakt, welcher Maltose (und Methylglukosid, nicht aber Rohrzucker) angriff, erhielt E. Fischer Spaltung von

Methylfruktosid, nicht aber Methylrhamnosid.

Die vielen Unstimmigkeiten, welche man in der Literatur hinsichtlich des Verhaltens der Hefen zu Maltose und daher auch hinsichtlich ihres Maltasegehaltes findet, sind durch die im folgenden eingehend besprochenen Arbeiten von Willstätter zum grossen Teil aufgeklärt worden.

Willstätter verdankt man auch die ersten quantitativen Maltosebestimmungen in Hefen.

Darstellung: In den älteren Vorschriften (E. Fischer, Lintner und Kröber, sowie Croft Hill) wird übereinstimmend erwähnt, dass es notwendig ist, Hefe zur Extraktion von Maltase zu trocknen.

Nach E. Fischer (H. 26) wird die gewaschene und möglichst scharf abgesogene Hefe auf porösen Tontellern in dünner Schicht ausgebreitet und bei Zimmertemperatur an der Luft getrocknet. Sie wird feinst zerrieben und abermals bei Zimmertemperatur oder bei 30—35° getrocknet. Bei diesem Zustand der Hefe ist die Maltase monatelang haltbar. Soll das Enzym dann zur Anwendung kommen, so wird die getrocknete Hefe mit der 10—15fachen Menge destillierten Wassers übergossen, bei 30—35° unter zeitweisem Umschütteln 12—20 Stunden ausgelaugt und die Flüssigkeit durch Papier filtriert. Als Antiseptikum empfiehlt sich Toluol. — Röhmann (Chem. Ber. 27) erhitzte seine Hefe vor der Extraktion während einer Stunde auf 105—110°, ein Verfahren, welches sich nach Croft Hill[4]) nicht empfiehlt. Letzterer Forscher trocknet die gewaschene Hefe zwei Tage lang auf poröser Unterlage im Vakuum über Schwefelsäure; sie wird dann gepulvert und durch ein Tuch gesiebt, wodurch man sie als gelblichweisses Pulver erhält. Das Erhitzen der auf feinem Tüll ausgebreiteten Hefe geschieht dann unter viertelstündiger Temperatursteigerung auf 60°, 70°, 90° und 100°. Zur Extraktion wird die Hefe im Mörser mit dem 10fachen Gewicht einer 0,1%igen Natronlauge verrieben, in Flaschen gefüllt und unter Zugabe von Toluol bei Zimmertemperatur drei Tage stehen gelassen. Hierauf wird der Extrakt filtriert, zuerst durch Papier, dann durch Chamberlandfilter.

[1]) E. Fischer, H. 26, 74; 1894. — Chem. Ber. 27, 3479; 1894.
[2]) E. Fischer und Lindner, Chem. Ber. 28, 3034; 1895.
[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 3479; 1894.
[4]) Croft Hill, Jl Chem. Soc. 73, 636; 1898.

Dass die Extraktion der Maltase aus Hefen im allgemeinen auf grössere Schwierigkeiten gestossen ist als die Extraktion von Saccharase, beruht nicht nur auf der Schwerlöslichkeit des ersteren Enzyms. Der Unterschied zwischen Saccharase und Maltase beruht nach Willstätter darauf, „dass in der Hefe nach ihrer Abtötung, z. B. durch Chloroform oder Toluol, durch enzymatische Vorgänge Bildung von Säure eintritt, durch welche die Maltase zerstört wird, etwa in dem Masse, wie sie in wässrige Lösung übergeht". Willstätter gelang es, aus frischer Bierhefe starke Maltaselösungen durch Behandlung mit Wasser unter Zusatz von Toluol bei Zimmertemperatur darzustellen, wenn die auftretende Säure durch Ammoniak neutralisiert wurde. Auch getrocknete Hefe gibt nach diesem Verfahren der Neutralextraktion mindestens ebenso wirksame Lösungen als nach den Angaben der Literatur.

„Da bei der Herstellung von Maltaselösungen die beiden Vorgänge: Diffusion des Enzyms aus der Hefezelle und seine Zerstörung durch zugleich entstehende Säure einander entgegenwirken, so ist die Schädigung entweder durch Alkalizusatz in dem Masse der Säureproduktion oder durch ein im Überschuss zugefügtes unlösliches Neutralisationsmittel zu vermeiden." Willstätter, Oppenheimer und Steibelt geben folgende Beschreibung einer Darstellung:

„88 g gewaschene und abgepresste untergärige Münchener Bierhefe wurden unter Zusatz von Toluol mit 132 ccm Wasser (entsprechend 20 g Trockenhefe + 200 ccm Wasser) geschüttelt. Die Flüssigkeit reagierte zunächst neutral, mitunter 50 Minuten lang, manchmal ist schon nach 5—6 Minuten die Reaktion deutlich sauer. Bei den verschiedenen Hefeproben sind erheblich differierende Alkalimengen erforderlich und auch etwas verschiedene Mengen je nach der Weise und Häufigkeit des Neutralisierens. Am besten ist es, häufig neutrale Reaktion auf Lackmus durch vorsichtigen Zusatz von verdünntem Ammoniak herzustellen, was bei einer Extraktionsdauer von 6 Stunden, z. B.

nach	6	20	55	130	180	360	Minuten
	0,6	0,3	12,6	10,5	3,6	4,9	ccm 1%iges Ammoniak,

also im ganzen 32,5, in einem anderen Beispiel 41,8 ccm erforderte. Bei weiterer Extraktion genügt es, alle 2—3 Stunden die immer geringer werdende Säureproduktion unschädlich zu machen. „Bequemer und annähernd ebenso günstig ist es, die Flüssigkeit durch Zusatz von Magnesiumkarbonat oder dergl. konstant bei fast neutraler Reaktion zu erhalten. Dagegen entstehen viel schwächere Ezymlösungen, wenn man die Hefe unter anfänglichem Zusatz bestimmter Mengen von Alkali extrahiert, wie Croft Hill vorschreibt..."

Um Maltase aus getrockneter Hefe zu bereiten, ist das Erhitzungsverfahren von Hill (siehe oben) unnötig.

„20 g Trockenhefe werden mit 200 ccm Wasser und mit Toluol angeschüttelt; die Flüssigkeit reagiert sauer und in diesem Fall wird zur Neutralisation sofort ein bedeutender Teil der überhaupt erforderlichen Alkalimenge verbraucht. Die Maltaselösung wird am besten nach etwa eintägigem Stehen abfiltriert; die Zeitwerte einiger Darstellungen gehen aus dem folgenden Auszug aus Willstätters Tabelle 4 (l. c. S. 240) hervor:

Extraktionsdauer Stunden	1 %ig. NH_3 für 20 g Hefe ccm	Drehungsabnahme in 30 Min.	Maltosespaltung % in 30 Min.	Zeitwert Min.
1	18,6	1,61°	25,1	140
19	23,2	2,22	34,6	77
15	24,2	2,42	37,8	55
5	—	2,05	32,0	82

Einen weiteren Fortschritt erzielten Willstätter und Steibelt (H. 111 157; 1920) durch die Erkenntnis, dass es sich bei der Gewinnung der Maltase nicht um die Einstellung einer günstigen Wasserstoffkonzentration in der wässrigen Zuckerlösung handelt, dass vielmehr das Störende hier die Erzeugung und die Wirkung von Säure in der Hefezelle selbst ist.

„Das Neutralisationsverfahren zur Gewinnung von Maltase aus Frischhefe wird daher noch verbessert, wenn man durch Verflüssigung der Hefe mittels Chloroform beschleunigte Bildung und Abwanderung der Säure herbeiführt und dann nach Neutralisieren der entstandenen und unter zeitweiligem Neutralisieren der weiter auftretenden Säure die Maltaselösungen fertigstellt.“ Die sich hieraus ergebende Methode der Maltasebestimmung s. S. 158.

Einfluss der Azidität der Lösung: Michaelis und Rona[1]) fanden für Maltase einer untergärigen Bierhefe das Wirkungsoptimum bei pH = 6,1 — 6,8 und den vermutlich besten Punkt bei 6,6. Über die nahestehende α-Methyl-Glukosidase siehe S. 148.

Überführungsversuche, welche die genannten Forscher anstellten, ergaben, dass die Maltase bei der Azidität der optimalen Wirkung anodisch wanderte. Die neueren Untersuchungen von Willstätter haben indessen gezeigt, dass Wanderungsrichtung im elektrischen Potentialgefälle, Adsorption und überhaupt die Erscheinungen, welche mit der Ionenladung zusammenhängen, stark von Fremdstoffen beeinflusst werden, welche sich in enzymhaltigen Präparaten und Lösungen — sofern diese nicht besonders eingehend gereinigt worden sind — stets in grosser Menge finden.

In vieler Hinsicht interessant, aber noch unerklärt, ist die von Willstätter und Kuhn[2]) beschriebene Elution der Maltase aus ihren Adsorbaten.

Der Einfluss von Neutralsalzen ist nach Michaelis und Rona (l. c., und zwar S. 76) kein irgendwie nennenswerter. Kalziumsalze hemmen indirekt durch Fällung.

---

[1]) Michaelis und Rona, Biochem. Zs 57, 70; 1913.
[2]) Willstätter und Kuhn, H. 116, 53; 1921.

Kinetik.

Der zeitliche Verlauf der Maltosespaltung erwies sich bei den bis jetzt vorliegenden Untersuchungen so verschieden, dass eine eingehendere Wiedergabe von Versuchsreihen einstweilen wenig Wert haben dürfte; ich beschränke mich deshalb auf einen Hinweis auf die Originalarbeiten von Lintner und Kröber[1]), E. F. Armstrong[2]) und R. O. Herzog[3]). Willstätter, Tr. Oppenheimer und Steibelt[4]) haben aus zwei eigenen Versuchsreihen die Abweichungen vom monomolekularen Verlauf graphisch dargestellt (Fig. 22). Als Ursache dieser Abweichungen können „hemmend

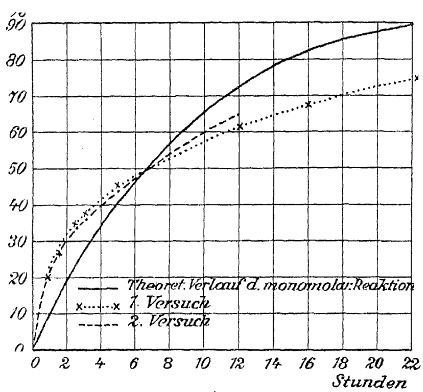


Fig. 22.

wirkende Beimischungen" angenommen werden (Willstätter); es wäre aber auch möglich, dass eine sterische Form der Maltose mit verhältnismässig hoher Geschwindigkeit hydrolysiert wird, während die durch den Verbrauch veranlasste Nachbildung dieser Form langsamer erfolgt.

Enzymkonzentration und Umsatz finden Willstätter, Oppenheimer und Steibelt in ziemlich weiten Grenzen genau proportional (l. c. S. 235).

Enzymmenge ccm in 50 ccm	Minuten	Drehungsabnahme °	Maltosespaltung %	Versuchsbedingungen
2	150	2,19	34,2	
5	60	2,20	34,4	5%ige Maltoselösung bei 30°
10	30	2,21	34,5	

Der Einfluss der relativen Mengen Enzym und Substrat wird aus der Untersuchung von E. F. Armstrong (l. c.) ersichtlich. Auch den Einfluss

[1]) Lintner und Kröber, Chem. Ber. 28, 1050; 1895, 70; 1913.

[2]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. 73, 500; 1904.

[3]) R. O. Herzog, Chemisches Geschehen im Organismus. Zs allg. Physiol. 4, 193; 1904

[4]) Willstätter, Tr. Oppenheimer und Steibelt, H. 110, 232; 1921.

der Spaltprodukte und anderer Zuckerarten hat Armstrong experimentell und theoretisch behandelt[1]). Er findet die Maltosespaltung sowohl durch Galaktose verzögert, nicht aber durch Glukose und Fruktose, während nach R. O. Herzog und Kasarnowski diese beiden Hexosen stark hemmen.

Temperatur.

Stabilität des Enzyms. Die Maltase erweist sich sowohl in der Hefe, als auch in Extrakten, als eines der labilsten zuckerspaltenden Enzyme; die Zerstörung macht sich schon bei gewöhnlicher Temperatur bemerkbar, wenn nicht die optimale Azidität eingehalten wird. Dies geht z. B. aus Versuchen von Michaelis und Rona hervor (l. c. S. 79), nach welchen ein Überschreiten des Optimalpunktes sowohl nach der sauren, als nach der alkalischen Seite hin stark schädigt.

Willstätter hat erkannt, dass diese Labilität im sauren Gebiet die bisherigen Darstellungsmethoden wesentlich beeinträchtigt hat.

Enzymbildung: In welchem Grad die Maltase in der Hefe durch Vorbehandlung mit verschiedenen Nährsubstraten angereichert werden kann, steht bis jetzt noch nicht fest. Im hiesigen Laboratorium sind Messungen an einer Hefe angestellt worden, welche von vornherein so gut wie gar keine Maltasewirkung zeigte. Weder Vorbehandlung mit Phosphat, noch mit Lösungen von starkem Peptongehalt oder hoher Maltosekonzentration konnte eine bedeutende Verstärkung der untersuchten Enzymwirkung hervorrufen.

Methoden zur Bestimmung der Wirksamkeit.

Was die analytischen Methoden zur Verfolgung der Maltasewirkung betrifft, so kommt zunächst eine der chemischen Bestimmungen der gebildeten Glukose in Betracht, welche am Schluss dieses Buches behandelt werden.

Einfacher und in vielen Fällen genauer ist die polarimetrische Verfolgung der Maltosespaltung. Willstätter arbeitet mit 10%igen Lösungen von wasserhaltiger Maltose und einem Zusatz von 20% Phosphat-Puffermischung (entsprechend $p_H = c:a\ 6{,}5$) bei 30°. Je 25 ccm der Maltoselösung wird mit Enzymlösung und Wasser auf das doppelte Volumen gebracht. Nach Beendigung der Versuche werden 25 ccm der Versuchslösung entnommen und unter Berechnung der Auslaufszeit in 5 ccm ½ n.-Sodalösung eingetragen. Anfangsdrehung nach Verdünnung mit der Sodalösung 10,80°; die theoretische Enddrehung würde 4,40° betragen.

Untersuchung der Hefe auf Maltasegehalt. Die Wirkung der frischen Hefe auf Maltose bei Gegenwart abtötender Mittel gibt nach Willstätters Befund noch kein Mass für ihren Maltasegehalt. „Fürs erste sind

[1]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B. 73, 516; 1904.

die Maltasezeitwerte, die sich für die Hefe bei verschiedenen Pufferzusätzen und bei einem bestimmten Pufferzusatz für verschiedene Versuchsdauer ergeben, nicht durchweg konstant. . . . Die enzymatische Wirkung der Hefe ist unter diesen Umständen ferner von dem abtötenden Mittel, z. B. Chloroform oder Toluol in merkwürdigem Masse abhängig. . . .“

Die entscheidende Verbesserung der Methodik, welche Willstätter eingeführt hat, besteht darin, dass man zuerst rasche Verflüssigung der Hefe bewirkt, die Säurebildung und Säureabgabe der Hefe also auf einen kurzen Zeitraum zusammendrängt, und dann erst verdünnt, neutralisiert und den Phosphatpuffer hinzufügt.

„Unter den abtötenden Mitteln ist Toluol wegen seiner zu langsamen Wirkung unanwendbar. Chloroform ist nicht das günstigste, weil das Ergebnis zu stark von seiner Menge abhängt und die optimale Menge sehr niedrig ist, so dass leicht Differenzen vorkommen können. Am geeignetsten ist Essigester. Auch hier ist ein Einfluss der Menge auf die Maltasewirkung deutlich, aber er ist nicht so gross.“

Willstätters Methode ist demgemäss folgende (Willstätter und Steibelt, H. 111, S. 168):

11 g Hefe werden im Becherglas mit 1 ccm Essigester versetzt und mit einem Glasstab 4—6 Minuten lang verrieben, bis die Verflüssigung vollständig geworden. Darauf wird die Hefe mit 20 ccm Wasser durchgerührt und alsbald tropfenweise mit $^1/_{10}$ n.-Ammoniak unter stetigem Rühren bis zur neutralen Reaktion versetzt, die man durch Tüpfeln auf hellblaues Lackmuspapier mit Vergleichsproben von destilliertem Wasser feststellt; erforderlich waren 7—9 ccm. Man wartet 10 Minuten und vervollständigt, wenn es nötig ist, die Neutralisation mit etwa 1,5 ccm. Die Hefesuspension wird nun in einen 50 ccm-Messkolben übergeführt, der knapp ausreicht. Zum Versuch entnimmt man nach sorgfältigem Umschütteln 20 ccm, die mit 5,0 g wasserhaltiger Maltose und dem Puffer (120 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ + 90 mg KH_2PO_4) ohne weiteren Zusatz eines antiseptischen Mittels auf 100 ccm gebracht werden. Messungen werden in zwei Intervallen ausgeführt, und zwar so, dass eine der Beobachtungen möglichst in die Nähe von 50% Maltosespaltung führt, z. B. mit 40 und 80 Minuten Versuchszeit.

Definition der Wirksamkeit.

Zeitwert. Nach Willstätter[1]) werden die Hefen und die Maltaselösungen durch die Zeit in Minuten bestimmt, die 1 g getrocknete Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung braucht, um bei 30° 2,5 g Maltose (Hydrat) zur Hälfte zu hydrolysieren, wenn diese mit 30 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ und 22,5 mg KH_2PO_4 in 50 ccm enthalten sind.

[1]) Willstätter, Tr. Oppenheimer und Steibelt, H. 110, 233; 1920. — Die Definition des Zeitwertes entspricht der für α-Methylglukoside gegebenen.

Schimmelpilz-Maltase.

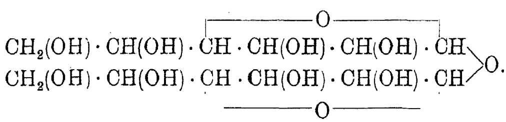
„Takadiastase" aus Aspergillus Oryzae enthält Maltase, wenn auch in relativ geringer Menge. Die Wirksamkeit dieser Aspergillus-Maltase erstreckt sich nach einigen Messungen von K. Josephson weiter ins saure Gebiet (bis etwa pH = 4), als diejenige der Hefemaltase.

4. Trehalase.

Substrat: Die Trehalose, $C_{12}H_{22}O_{11} + 2\,H_2O$, Schmelzp. 96,5°—97,5°, ist isomer mit Maltose und liefert bei der Spaltung ebenfalls 2 Moleküle Glukose. Die Drehung beträgt nach Hudson $[\alpha]_D^{20} = +197°$. Mutarotation ist bei diesem Zucker nicht beobachtet.

Trehalose reduziert Fehlingsche Lösung nicht, bildet auch kein Osazon; sie enthält also keine Gruppe, welche Aldehydreaktionen gibt.

Die Konstitution kann durch folgende Formel dargestellt werden:

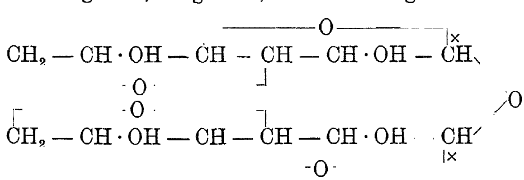


Theoretisch möglich sind drei Diglukosen vom Trehalose-Typus:

α, α
β, β
α, β.

Hudson[1]) nimmt auf Grund der Drehung an, dass die Trehalose die α, α-Form darstellt. Die Isotrehalose liegt vielleicht in dem von E. Fischer und K. Delbrück[2]) aus Aceto-Bromglukose und Silberoxyd gewonnenen amorphen Präparat vor; das dritte isomere ist unbekannt.

Neuerdings hat Karrer[3]) zwei Anhydrozucker vom Trehalosetypus, Diglucan und Isodiglucan, dargestellt, welche er folgendermassen formuliert:



Sie unterscheiden sich durch die Symmetrieverhältnisse an den mit × bezeichneten Kohlenstoffatomen.

Vorkommen: Bourquelot, welcher die Trehalase zuerst benannt und beschrieben hat[4]), fand dieselbe in Schimmelpilzen, und zwar zunächst

[1]) Hudson, Jl Amer Chem. Soc. 38, 1566; 1916.
[2]) E. Fischer und K. Delbrück, Chem. Ber. 42, 2776; 1909.
[3]) Karrer, Widmer und Smirnoff, Helv. 4, 796; 1921.
[4]) Bourquelot, C. r. 116, 826; 1893. — Bull. Soc. Mycol. 9, 49, 189, 230; 1893.

in drei Arten, nämlich Aspergillus niger, Penicillium glaucum und Volvaria speciosa, später in Polyporus sulphureus[1]). Mit Hérissey wies er das gleiche Enzym in zahlreichen Hymenomyzeten nach[2]), besonders in Azaricineen, Boletus-Arten (und zwar teilweise sowohl im Fuss als im Hut), in Russula delica usw.

E. Fischer konnte das Vorkommen eines spezifischen, Trehalose spaltenden Enzyms bestätigen, und zwar nahm er Trehalase auch in Reinhefen vom Frohbergtypus an[3]). Kalanthar[4]) untersuchte verschiedene Hefen auf ihren Trehalasegehalt, ebenso Bau[5]); dieser Forscher fand „über die Gegenwart eines spezifischen, Trehalose spaltenden Enzyms in untergäriger Hefe kein sicheres Resultat" und hält es nicht für angebracht, ein solches für die echten Hefen, soweit sie untersucht sind, anzunehmen. Die unregelmässigen Resultate dürften hauptsächlich in den Mängeln der angewandten Methodik ihren Grund haben.

Vergärung von Trehalose wurde auch noch von Went in Monilia sitophila, von Rommel und Sitnikoff in Amylomyces α und γ, von Lindner[6] in zahlreichen Weinhefen, in Monilia candida und in Mucor Rouxii beobachtet. Nach den von Willstätter an Maltose gewonnenen Ergebnissen ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch die Trehalose einer direkten Vergärung ohne vorhergehende Hydrolyse unterliegen kann, so dass die Vergärungsversuche von Bau, Lindner u. a. über die Gegenwart oder Abwesenheit einer Trehalase an sich noch nichts aussagen würden.

Ob Trehalase im Grünmalz gebildet wird, oder ob, wie Bourquelot annimmt, die spaltende Wirkung des Grünmalzes auf der Gegenwart von Schimmelpilzen beruht, steht noch nicht fest.

Im Tierreich fanden sowohl Bourquelot und Gley[7]) (Darmsaft), als besonders Fischer und Niebel[8]) Trehalase; auffallend wirksam gegen Trehalose war das Blut des Karpfens; bei den meisten sonst untersuchten Tieren zeigte das Blutserum spaltende Fähigkeit gegen Maltose, nicht aber gegen Trehalose.

Darstellung: Bourquelot (C. r. 1893) züchtete Aspergillus auf Raulinscher Lösung. Nach eingetretener Sporenbildung hebt man das Myzel ab, wäscht es, zerreibt mit Sand und lässt mit Alkohol 6 Stunden stehen. Man sammelt die Masse auf einem Filter und trocknet im Vakuum. Das

[1]) Bourquelot und Hérissey, Bull. Soc. Mycol. 10, 235; 1895.

[2]) Bourquelot und Hérissey, Soc. Biol. 57, 409; 1904. — Bull. Soc. Mycol. 21, 1; 1905.

[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1429; 1895.

[4]) Kalanthar, H. 26, 88; 1898.

[5]) Bau, Woch. Brau. 16, 305; 1899 und 32, 141; 1915. Biochem. Zs 73, 340; 1916. — Siehe auch Lafars Handbuch 4, 421; 1906.

[6]) Lindner, Woch. Brau. 17, 713; 1900 und 28, 612; 1919.

[7]) Bourquelot und Gley, Soc. Biol. 47, 515; 1895.

[8]) Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. d. Wiss. 75, 73; 1896.

getrocknete Material wird zur Gewinnung des Enzyms mit Wasser verrieben und stehen gelassen; den filtrierten Extrakt fällt man mit Alkohol. Diese Fällung wird wieder durch Filtration von der Mutterlauge befreit, mit Alkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Dem von der Nährlösung abgehobenen Myzel soll man durch destilliertes Wasser im Verlauf von mehreren Tagen Trehalase entziehen können.

Aziditätsoptimum. Nach Bourquelot in schwach saurer Lösung (0,003 % H_2SO_4); auch hierin scheint sich das Enzym von der Maltase zu unterscheiden, die ein annähernd neutrales Medium bevorzugt; genauere Messungen fehlen.

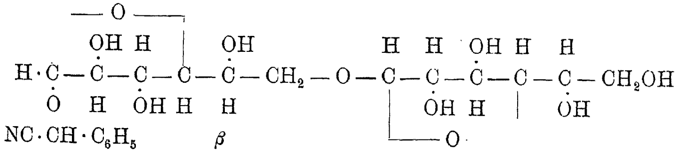
Einfluss der Temperatur. Bei der Untersuchung der wässrigen Enzymlösung fand Bourquelot von 53° an bezüglich Trehalosespaltung eine Schwächung, bei 63° vollständige Zerstörung; dagegen bleibt die Maltasewirkung bis gegen 64° unverändert und verschwindet erst zwischen 74°—75°. Diesen Angaben muss natürlich eine grosse Unsicherheit anhaften, besonders da sich nur eines der beiden Enzyme bei der Azidität des Stabilitätsmaximums befunden haben dürfte. Auch erscheint die Stabilität der Maltase auffallend hoch. Immerhin ist es natürlich wohl möglich, dass die beiden Enzyme sich hinsichtlich ihrer Temperaturbeständigkeit unterscheiden. Trehalase soll nach Bau (1905) beim Trocknen der Hefe recht wenig stabil sein.

5. Amygdalase.

Substrat: Das einfachste Substrat dieses Enzyms ist die Amygdalose, eine Diglukose, welche nach Giaja[1]) aus Amygdalin unter der Einwirkung des Presssaftes von Helix pomatia entstehen soll. Giaja beschreibt diesen Zucker als nicht reduzierend; seine Reinigung und weitere Charakterisierung ist bis jetzt noch nicht gelungen.

Die Amygdalose muss jedenfalls eine Komponente des Amygdalins sein und wird im Amygdalinmolekül von der Amygdalase angegriffen.

Die Konfiguration des Amygdalins ($C_{20}H_{27}NO_{11} + 3\,H_2O$, $[\alpha]_D^{18} = -41^0\,16'$ (p = 1,64) Auld) wird von Auld[2]) folgendermassen dargestellt:



Wie schon Fischer festgestellt hatte, enthält das Glukosid selbst keine freie Aldehydgruppe.

[1]) Giaja, Soc. Biol. 71, 509; 1911.
[2]) Auld, Jl Chem. Soc. 93, 1276; 1908.

Unter der Einwirkung eines Hefenenzyms, der „Amygdalase“, wird Amygdalin in Glukose und Mandelsäurenitrilglukosid gespalten.

Fischer[1]) hielt die Diglukose des Amygdalins für Maltose „oder eine ganz ähnlich konstruierte Diglukose“. Indessen greift das im „Emulsin“[2]) enthaltene Enzymgemisch Maltose nicht an, während es gegenüber Amygdalin wirksam ist[3]).

Vorkommen: Amygdalase findet sich in „Emulsin“, also im Extrakt süsser oder bitterer Mandeln, vielleicht auch in Salix caprea (Bolin) und in deutschen Bierhefen (Bau), aber nur in sehr geringen Mengen.

Die Verschiedenheit der Amygdalase von Maltase ist besonders durch eine Untersuchung von Caldwell und Courtauld[4]) dargetan worden. Durch Erwärmen eines Auszuges aus Oberhefe auf 45°—50° kann die Wirksamkeit der Lösung gegen Maltose fast vollständig aufgehoben werden, während die Fähigkeit zur Amygdalinspaltung unverändert ist.

Erhitzen auf 55°—60° hebt auch die Amygdalasewirkung auf, während die Rohrzuckerspaltung erhalten bleibt; durch letztere Tatsache wird nach Caldwell und Courtauld die Verschiedenheit der Amygdalase von Saccharase bewiesen.

Hierzu muss allerdings gesagt werden, dass die Aziditäts- und Temperaturempfindlichkeit eines einzigen Enzyms gegenüber verschiedenen Substraten verschieden sein könnte, so dass ein ganz bindender Beweis nicht vorliegt. Ausserdem ist das Verhalten der Amygdalase zu α-Methylglukosid noch nicht aufgeklärt, so dass dieses Enzym mit der α-Methylglukosidase identisch sein könnte.

Aziditätsbedingungen. Bertrand und Compton[5]) hatten angegeben, dass das Optimum im alkalischen Gebiet liegt, die Lage sollte sich mit der Zeit ändern; dagegen findet Willstätter für die kombinierte Amygdalase- und Prunasewirkung $pH = 6$.

Auch „Emulsin“ aus Presssaft von Helix pomatia spaltet nach Giaja (l. c.) 1 Molekül Glukose aus Amygdalin ab, dürfte also eine Amygdalase enthalten. Diese Enzymwirkung lässt sich nach dem gleichen Autor durch Glukosezusatz zurückdrängen, wodurch die Abspaltung von Amygdalose gelingen soll.

Kinetik. Da das einfache Substrat, Amygdalose noch nicht dargestellt ist, muss die Prüfung an Amygdalin erfolgen. Der Spaltungsverlauf dieses

---

[1]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1508; 1895.

[2]) Als „Emulsin“ bezeichnen wir das Enzympräparat, welches nach Wöhler und Liebig (1837), besser nach Bourquelot und Hérissey, aus dem wässrigen Mandelextrakt durch Fällen mit Alkohol erhalten wird. Das Emulsin enthält mehrere Enzyme und kann also nicht als Bezeichnung für ein besonderes Enzym gebraucht werden. Siehe ferner das Kapitel β-Glukosidasen.

[3]) Siehe hierzu auch Rosenthaler, Arch. d. Pharm. 245, 684; 1908.

[4]) Caldwell und Courtauld, Proc. Roy. Soc. Bd. 79, 350; 1907.

[5]) G. Bertrand und A. Compton, C. r. 159, 434; 1914.

Glukosids in Gegenwart von Emulsin ist, wie zu erwarten, etwas kompliziert, da drei Reaktionen nebeneinander hergehen:

1. die Spaltung des α-Glukosids durch die Amygdalase,
2. die Abspaltung einer β-Glukose aus dem Mandelsäurenitrilglukosid (Prunasin der englischen Literatur) durch eine β-Glukosidase („Prunase") des Emulsins.
3. die Spaltung des Mandelsäurenitrils in Benzaldehyd und Blausäure.

Wir kommen auf die enzymatische Spaltung des Amygdalins bei der Besprechung der β-Glukosidasen noch zurück und verweisen einstweilen besonders auf die Arbeiten von H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton[1], sowie Willstättter und Csányi[2]) und Auld (l. c.).

Einfluss der Temperatur: Wie schon oben erwähnt, wird das Hefenenzym, welches Glukose aus Amygdalin abspaltet, bei Erhitzen auf 55°—60° inaktiviert.

B. α-Fruktosidasen.

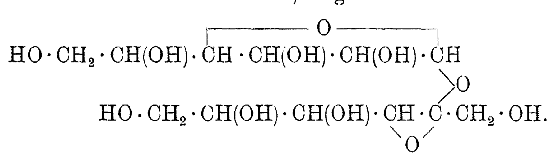
Saccharase (Invertin).

Substrat: Rohrzucker, $C_{12}H_{22}O_{11}$, kristallisiert in grossen monoklinen Kristallen ohne Wasser; zeigt in wässriger Lösung vom Prozentgehalt $p = 4 - 18$ die Drehung

$$[\alpha]_D = 66{,}87 - 0{,}0155\,p,$$

ziemlich unabhängig von der Temperatur.

Die Hydrolyse in die Komponenten Glukose und Fruktose erfolgt durch Säuren bei diesem Zucker schneller als bei der Maltose. Die Fischersche Formel ist durch Haworth und Law[3]) folgendermassen modifiziert worden:



Bei der Hydrolyse würde demnach γ-oxydische Glukose und α-oxydische Fruktose entstehen; dieselben sollen zum Teil in α-oxydische Glukose und γ-oxydische Fruktose umgewandelt werden, und alle vier Stoffe sollen Gleichgewichte zwischen α- und β-Formen bilden. Für die Methodik ist die schon von O'Sullivan und Tompson[4]) berücksichtigte Tatsache wesentlich, dass die optische Drehung des bei der enzymatischen Spaltung auftretenden Hexosegemisches nicht beständig ist, sondern (besonders schnell

[1]) H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. 80, 321; 1906.
[2]) Willstätter und Csányi, H. 117, 172; 1921.
[3]) Haworth und Law, Jl Chem. Soc. 109, 1314; 1916.
[4]) O'Sullivan und Tompson, Jl Chem. Soc. 57, 834; 1890.

durch Zusatz von OH' und H'-Ionen) im positiven Gebiet sinkt, im negativen Gebiet ansteigt.

Verschiedenheit und Einteilung der Saccharasen. Sowohl mit tierischen als mit pflanzlichen Organextrakten und Säften lassen sich starke rohrzuckerspaltende Wirkungen erzielen. Es hat sich in der letzten Zeit ergeben, dass diese Enzyme, je nach der Herkunft, wesentliche Verschiedenheiten aufweisen, die sich — wenigstens gegenwärtig — nicht auf Verschiedenheiten der Lösungskomponenten zurückführen lassen. Es empfiehlt sich deswegen, die tierischen und die pflanzlichen Saccharasen getrennt zu behandeln und letztere in die Saccharasen der Phanerogamen und der Kryptogamen einzuteilen.

1. Tierische Saccharasen.

Vorkommen. Hinsichtlich Organen höherer Tiere ist in erster Linie der Darm zu nennen; jedenfalls kommen andere Organe im Vergleich zum Wirksamkeitsgrad des Darmes kaum in Betracht[1]). Vandevelde[2]) beobachtete Rohrzuckerspaltung durch Pankreasextrakt. Die Angabe von Jona[3]), dass der nach Reiz durch Rohrzucker abgesonderte Speichel Saccharase enthält, schien mir Nachprüfung zu verdienen. Der Effekt war gering. Bemerkenswert ist, dass die rohrzuckerspaltende Wirkung des Blutes höherer Tiere sehr klein ist; wir kommen später hierauf zurück. — Niedrigere Tiere: Wie zu vermuten ist, enthält die Honigblase der Bienen Saccharase[4]); Erlenmeyer[5]) hat das Enzym zuerst im Bienenspeichel gefunden. Aber auch in anderen Insekten ist Saccharase nachgewiesen worden (Axenfeld 1903; Piéron 1907). Der Verdauungstraktus von Schnecken enthält neben vielen anderen Enzymen auch Saccharase.

Darm-Saccharase.

Was die Lokalisation des Enzyms betrifft, so ist die Frage noch unerledigt, ob und in welchem Grade die Saccharase im Darm-Saft (Fistelsaft) vorkommt, ferner in welchen Zellen der Darm-Mucosa die Bildung und ev. Abscheidung des Enzyms erfolgt.

Die ersten, 1877 von Cl. Bernard angestellten Versuche zeigten schon, dass die Rohrzuckerspaltung durch die Darmschleimhaut jedenfalls stärker katalysiert wird als durch den Darmsaft. Bei älteren Versuchen mit Darm-

[1]) Die Angaben von Robertson (Edinburgh Med. Jl 39, 2: 1894) über das allgemeine Vorkommen von Saccharasen sind nachzuprüfen.

[2]) Vandevelde, Biochem. Zs 23, 324; 1909.

[3]) Jona, Jl of Physiol. 40, 21; 1910.

[4]) H. Petersen, Pflüg. Arch. 145, 121; 1912. — Saccharase im Honig: v. Fellenberg, Mitt. Leb. u. Hyg. 2, 369; 1912; daselbst Literatur. — Caillas, C. r. 170, 589; 1920.

[5]) Erlenmeyer, Sitz.-Ber. Bay. Akad. 1874, 205.

saft vom Menschen haben allerdings Demant, Vella, Busch und Leube, 1902 auch Nagano, invertierende Wirkung gefunden; quantitative Angaben werden aber nur von Busch gemacht, der sein Resultat an einer mit Darmfistel versehenen Patientin gewonnen hat.

Einen noch schärferen Unterschied fanden Röhmann[1]) sowie Tubby und Manning[2]). Menschlicher, mittels einer Fistel gewonnener Darmsaft invertiert nicht oder in äusserst geringem Grad, wogegen die Darmschleimhaut eine ausgesprochene Wirksamkeit besitzt.

Tierversuche. Von vornherein muss nach E. Fischer[3]) berücksichtigt werden, dass bei der Generalisierung auf diesem Gebiet grosse Vorsicht geboten ist. Es wurden nämlich von verschiedenen Autoren an verschiedenen Tieren ganz voneinander abweichende Resultate gefunden.

Mehrere der in den 80er Jahren mit „Darmsaft" ausgeführten Versuche sind übrigens wegen der ungeeigneten Methodik sowie wegen unzureichender Angabe über die Lage des untersuchten Darmstückes kaum verwertbar.

Mit Darmsaft erhielten Bastianelli sowie Lafayette B. Mendel beim Hund Inversion.

Demgegenüber stehen die genaueren, ebenfalls am Hundedarmsaft mittels Jejunumfistel gewonnenen Resultate von Röhmann und Nagano[4]), bei welchen sich nur eine sehr schwache Inversion ergab, sowie negative Ergebnisse von Lehmann[5]) am Darmsaft der Ziege.

Mit Darmmucosa vom Hund wurde Rohrzuckerspaltung erzielt von Grünert[6]), der sie in frischem Zustand, und von Krüger[7]), der sie nach dem Trocknen als Pulver verwendet hat[8]).

Bierry[9]) verdankt man neuere sorgfältige Versuche, die ebenfalls am Hund angestellt sind, und zwar

1. mit natürlichem Darmsaft, wie er durch eine Dauerfistel ausgeflossen war,
2. mit solchem Darmsaft, nachdem er durch Zentrifugieren geklärt worden war,
3. mit zentrifugierten Darmmazerationen.

Bierrys Ergebnis ging dahin, dass der reine „physiologische" Fistelsaft nicht invertiert. Die Wirksamkeit des trüben unzentrifugierten Saftes

---

[1]) Röhmann, Pflüg. Arch. 41, 424; 1887.

[2]) Tubby und Manning, Guys Hospital Rep. 48, 271; 1892.

[3]) E. Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. d. Wiss. 75, 73; 1896. Diese Autoren haben an verschiedenen Tieren leider nur das Duodenum untersucht.

[4]) Röhmann und Nagano, Pflüg. Arch. 95, 533; 1903.

[5]) Lehmann, Pflüg. Arch. 33, 180; 1884.

[6]) Grünert, Zbl. f. Physiol 5, 285.

[7]) Krüger, Zs f. Biol. 37, 229; 1899.

[8]) S. auch Miura, Zs f. Biol. 32, 266; 1895. — Getrockneten Schweinsdarm haben H. T. Brown und Heron aktiv gefunden, Jejunum und Ileum gleichmässig.

[9]) Bierry, Biochem. Zs 44, 415; 1912. — S. auch Bierry und Frouin, C. r. 142, 1565; 1906.

ist auf die Gegenwart von Darmschleimhautzellen zurückzuführen. Wirksam sind demgemäss auch Mazerationssäfte der Darmschleimhaut.

Man kann der Literatur wohl das Ergebnis entnehmen, dass der Darmsaft, wenn er Rohrzucker spaltet, im allgemeinen im Vergleich zu der Darmschleimhaut wenig wirksam ist, soweit nicht besondere Reizung durch Rohrzucker eintritt[1]).

Es ist dann die Rolle der Lymphozyten zu erwägen. Die enzymatische Wirksamkeit isolierter Lymphozyten ist in letzterer Zeit von Mancini[2]) und von Tschernoruski[3]) studiert worden, aber einen eventuellen Gehalt an Saccharase haben diese Autoren nicht mitgeteilt. Man weiss, dass die Mucosa des Dünndarmes ziemlich reich an Lymphozyten ist; aber zu einer Schätzung ihrer Zahl per Flächeneinheit Darmschleimhaut reichen die vorliegenden Angaben nicht aus. Immerhin dürften die oben erwähnten Versuche nicht wesentlich von den Lymphozyten beeinflusst sein. Siehe auch S. 187.

Nach Ansicht des Verfs.[4]) wird die Rohrzuckerspaltung im Darm durch ein Enzym vermittelt, welches nicht — oder wenigstens nicht direkt — in wässrige Lösung geht, und welches als sog. Endoenzym an der Oberfläche der Mucosa bzw. von Mucosabestandteilen wirkt.

In der histologischen Literatur wird, wenn die enzymatische Wirkung des Darmes behandelt wird, in der Regel nur von den Lieberkühnschen Drüsen gesprochen. Über die Zahl der Lieberkühnschen Drüsen per Oberflächeneinheit Darmwand scheinen in der histologischen Literatur bis jetzt keine genauen Angaben vorzuliegen. Nach mikroskopischen Schnitten lässt sich schätzen, dass auf 1 qcm Darmwand rund 100 Lieberkühnsche Drüsen kommen, wobei die Zotten berücksichtigt sind. Wegen der Kergringschen Falten ist aber die Oberfläche der Mucosa grösser, als die an der äusseren Darmwand vorgenommene Ausmessung ergeben hat, und zwar etwa um 150%, so dass auf den qcm rund 250 Lieberkühnsche Drüsen kommen würden.

Sieht man von dem Sekret dieser Drüsen ab, so wäre mit ihrer wirksamen Oberfläche zu rechnen. Als Dimensionen findet man in der Regel angegeben 0,4—0,3 mm Länge und einen Durchmesser an der Öffnung von im Mittel 60 μ. Die Oberfläche einer Lieberkühnschen Drüse kann im Mittel auf 0,1 qmm geschätzt werden. Indessen kann keineswegs die Gesamtoberfläche der Lieberkühnschen Drüsen als aktive Oberfläche für unsere enzymatische Wirkung in Betracht kommen.

Rechnet man nur den oberen Rand der Lieberkühnschen Drüsen als wirksame Kontaktfläche, so erhält man abgerundet für jede Drüse 0,003 qmm Oberfläche, also per qcm Darm 0,75 qmm, oder bei einer Mucosaoberfläche des Jejunums von 1500 qcm rund 10 qcm wirksame Drüsenoberfläche.

Zum Vergleich kann angegeben werden, dass 1 g der eingehend untersuchten Unterhefe H eine Oberfläche von 26000 qcm besitzt.

Euler und Svanberg (l. c.) haben die Verteilung der Saccharase in den verschiedenen Teilen des menschlichen Darmes untersucht und stellen ihre Resultate in folgender Tabelle zusammen, in welcher k die Inversionskonstanten (gemessen bei 32°) bezeichnen:

---

[1]) Siehe hierzu auch E. v. Knaffl-Lenz, H. 119, 60; 1922.

[2]) Mancini, Biochem. Zs 26, 140; 1910.

[3]) Tschernoruski, H. 75, 216; 1911.

[4]) Vgl. Euler und Svanberg, H. 115, 43; 1921.

Darmteil	Länge	Fläche		qcm $\cdot 10^5$
Duodenum, Pylorusteil	9 cm,	81 qcm	0,011	13,5
Duodenum, Pankreasteil	8 „	80 „	0,015	19
Jejunum, 1,5 m distal vom Duodenum .	12 „	48 „	0,024	50
Jejunum, 1—30 cm vom Duodenum . .	6 „	42 „	0,037	88
Ileum, Abschnitt vor Eintritt ins Caecum	6 „	42 „	0,0015	4

Es geht aus den obigen Zahlen auch hervor, dass der Saccharasegehalt des menschlichen Ileums pro qcm Darmwand nur etwa 5% desjenigen des Jejunums beträgt.

Zum Vergleich sei angegeben, dass der Wert $10^5 \cdot k/qcm$ für den mittleren Teil eines Schweinsdarms zu 5 gefunden wurde.

Berechnet man den gleichen Wert für Unterhefe H, so ergibt sich für $k \cdot 10^5$ pro qcm der Wert 2,4.

Aziditätsbedingungen. Nach den eingehenden Messungen von Sörensen, Michaelis u. a. liegt das Aziditätsoptimum der Hefensaccharase bei pH = 4,5. Da andererseits die $H^{\cdot}$-Konzentration des Darmsaftes von Auerbach und Pick zu $h = 0{,}5 \cdot 10^{-8}$ angegeben wird, so war es von allgemeinem Interesse, die Wirksamkeit der Darmsaccharase bei diesem Säuregrad zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass in dieser Hinsicht zwischen dem rohrzuckerspaltenden Enzym des Darms und dem der Hefe beträchtliche Unterschiede bestehen.

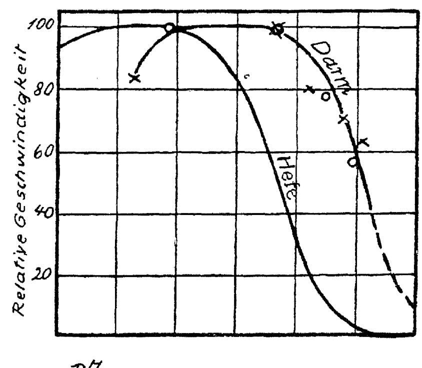


Fig. 23.

Dieselben gehen am deutlichsten aus vorstehender Figur hervor, welche zeigt, dass die Saccharase des Menschendarms ihr Aziditätsoptimum bei pH = 5—7 besitzt, also bei einer $H^{\cdot}$-Konzentration, welche etwa 50mal kleiner ist, als die für Hefensaccharase normale.

Die mit Darmextrakt erhaltenen Inversionskonstanten sind die folgenden:

Anfängl. p_H	Schliessl. p_H	k	Relative Geschwindigkeit
4,5	5,25	0,00372	100
6,6	6,84	0,00372	100
7,5	7,48	0,00291	78
8,0	7,95	0,00213	57

Kinetik. Euler und Svanberg (l. c.) haben ihre Versuche teils direkt mit fein zerschnittenem normalem Darm angestellt, teils mit Darmextrakt. Im ersteren Fall waren die absoluten Geschwindigkeiten grösser, die Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung, $k = 1/t \ln a/a-x$, gaben eine genügende Konstanz, wie folgendes Beispiel zeigt (l. c. Beilage 13):

Stunden	Drehung	k
0	2,40	
20	0,29	0,023
29	0,09	0,022
168	—	

Bei Anwendung von Darmextrakt fielen die k-Werte kleiner aus und nahmen im allgemeinen im Verlauf eines etwa 1 Tag dauernden Versuchs ab, vermutlich infolge der Labilität des Enzyms; siehe auch Euler und Myrbäck[1]).

Einfluss der Temperatur. Da sich hinsichtlich der optimalen Azidität deutliche Unterschiede zwischen Darm- und Hefesaccharase ergeben hatten, wurde von Euler und Myrbäck[1]) auch die Temperaturstabilität der Darmsaccharase näher studiert. Wurde der Darmextrakt 1 Stunde auf verschiedene Temperaturen (bei optimaler Azidität) erhitzt, so ergab sich:

Erhitzungstemperatur	18°	45°	50°	52°	55°
Inversionskonstante $k \cdot 10^4$	23	23	15	7	0.

Berechnet man hieraus den Inaktivierungskoeffizienten $k_c \cdot 10^4$ nach der Formel (32)

$$k_c = \frac{1}{t} \log \frac{k_a}{k_t},$$

(siehe Teil I, S. 175), so erhält man:

Erhitzungstemperatur	18°	45°	50°	52°	55°
Inaktivierungskoeffizient $k_c \cdot 10^4$	0	0	31	86	∞.

Mit einer Lösung von Hefensaccharase von ähnlicher absoluter Wirksamkeit erhält man:

Erhitzungstemperatur	18°	50°	55°	58°	60,5°
Inaktivierungskoeffizient $k_c \cdot 10^4$	0	0	19	45	161.

Die Temperatur der halben Inaktivierung bei 1stündiger Erhitzung ergibt sich aus den erwähnten Messungen für

Darm-Saccharase	51°
Hefe-Saccharase	58,3°.

Man findet also einen Temperaturunterschied in der Stabilität der beiden Enzyme von über 7°.

Natürlich bleibt immer die Möglichkeit, dass die eigentlich wirksamen Teile der beiden Saccharasen identisch sind und dass die Verschiedenheiten nur auf dem Einfluss von Fremdstoffen beruhen, welche in irgendeiner Weise mit dem Enzym verbunden sind.

[1]) Euler und Myrbäck, H. 115, 68; 1921.

2. Saccharasen der Phanerogamen.

Vorkommen. Die ausserordentlich grosse Verbreitung der Saccharase im Pflanzenreich geht aus einer Arbeit von Kastle und Clark[1]) hervor. Dieselben fanden Saccharase nicht nur in solchen Pflanzenteilen, welche Rohrzucker als Reservestoff enthalten, sondern weit allgemeiner, überall da, wo Stärke oder Inulin aufgespeichert wird.

Man findet Saccharasen in grünen Blättern (z. B. von Tropaeolum[2]), Tabak[3]), Kartoffel[4]) Polyscias nodosa), Früchten[5]), besonders in Körnern der Gramineen[6]), in Pollen[7]), in Stengeln, Knollen (Kartoffel), seltener in Wurzeln und Rüben.

Besonderes Interesse verdient die Verteilung der Saccharase in der Zuckerrübe, welche zuerst von Robertson, Irvine und Dobson[8]), dann von Ruhland[9]) und von H. Collin[10]) studiert worden ist. In der Rübe von Beta vulgaris wird unter normalen Verhältnissen keine Saccharase angetroffen, und zwar weder im 1. noch im 2. Jahr; sehr saccharasereich sind dagegen die Beta-Blätter; der Enzymgehalt des Stammes nimmt vom Blatt bis zur Wurzel ab.

Darstellung. In der Regel lässt sich ein saccharasehaltiger Saft durch Auspressen des frischen Materials gewinnen; derselbe enthält aber oft oxydierende Enzyme und Polyphenole und lässt sich deswegen nicht immer direkt zu Versuchen benutzen. Es empfiehlt sich also, die Saccharase durch Alkohol oder Azeton aus dem Presssaft auszufällen, oder aber das Pflanzenmaterial zu trocknen und dann mit Wasser oder einer verdünnten Phosphatlösung zu extrahieren.

Die von Vinson (l. c.) studierte Dattelsaccharase soll erst bei der Reife löslich werden, während die unreifen Früchte das Enzym an einen unlöslichen Stoff gebunden enthalten.

Kinetik. Einige Versuche mit Saccharase aus Kartoffelknollen teilt Doby (l. c.) mit.

[1]) Kastle und Clark, Amer. Chem. Jl 30, 422; 1903.
[2]) Brown und Morris, Trans. Chem. Soc. 63, 604; 1893.
[3]) Oosthuizen und Shedd, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1289; 1913. — Mosca, Gazz. chim. ital. II, 431; 1913.
[4]) Doby, Biochem. Zs 71, 495; 1916.
[5]) Besonders genau untersucht ist das Enzym der Dattel, und zwar von Vinson, Jl Amer. Chem. Soc. 30, 1005; 1908.
[6]) J. O'Sullivan, Jl Chem. Soc. 77, 691; 1900.
[7]) van Tieghem, Bull. Soc. Bot. France 33, 216; 1886.
[8]) Robertson, Irvine und Dobson, Biochem. Jl 4, 258; 1909.
[9]) Ruhland, Zs Ver. D. Zuckerind. 1912, 1.
[10]) H. Collin, C. r. 160, 777; 1915.

3. Saccharase der Kryptogamen.

Hefen-Saccharase.

Vorkommen. Ein Rohrzucker hydrolysierendes Enzym dürfte sich in den meisten Hefen finden, sehr wahrscheinlich ausnahmslos in den Kulturhefen unserer Gärungsgewerbe und in den eigentlichen Weinhefen. Nach den meisten Verfassern wäre die Verbreitung der Hefensaccharase in einem noch viel grösseren Gebiet sichergestellt; indessen ist der Nachweis in der Mehrzahl der Fälle dadurch geführt worden, dass man die Fähigkeit der verschiedenen Hefen zur Vergärung des Rohrzuckers beobachtet hat[1]. Nimmt man mit Willstätter und Steibelt[2]) an, dass Disaccharide auch direkt der Vergärung unterliegen können, so ist die Vergärung eines solchen Zuckers an sich kein Beweis mehr für die Gegenwart des betreffenden hydrolysierenden Enzyms.

Sicher muss man von denjenigen Hefen, welche Rohrzucker nicht, wohl aber Glukose, vergären, annehmen, dass sie keine Saccharase enthalten; nach Willstätter fehlt ihnen aber ausserdem die spezifische Rohzuckerzymase (oder ihr Co-Enzym).

Die Abwesenheit der Saccharase galt solchermassen als allgemein nachgewiesen in Saccharomyces apiculatus; indessen wies Klöcker 1913 nach, dass zahlreiche Apiculatus-Formen existieren, welche Rohrzucker vergären. Es wäre nunmehr noch festzustellen, ob in diesen Formen nur die Vergärung von Rohrzucker erfolgt oder ob dieselben freie Saccharase enthalten.

Über die Methodik der Saccharasebestimmung in frischen Hefen siehe S. 202. In der Tabelle S. 171 sind die hier untersuchten Hefen aufgenommen.

Isolierung der Saccharase.

Eine ausgezeichnete Kritik der Methoden zur Isolierung der Saccharase aus der Hefe verdankt man Willstätter, dessen Darstellung wir hier folgen.

Die verschiedenen Isolierungsmethoden unterscheiden sich im wesentlichen darin, dass nach den einen der Zellinhalt ohne enzymatischen Abbauvorgang von den Zellwänden bzw. von den festen und unlöslichen Bestandteilen der Zelle abgetrennt wird, während er nach den anderen Verfahren durch enzymatische Reaktionen chemisch verändert wird, ehe man ihn von den Heferesten entfernt.

Die erstgenannten Methoden (Michaelis, Meisenheimer) zielen darauf hin, durch Zerstörung der Zellstruktur die Saccharase, welche von der lebenden Hefe nicht an Wasser abgegeben wird, in Lösung überzuführen. Die Ergebnisse sind, wie Willstätter[3]) betont, stets unbefriedigend, „weil sich die Saccharase in solchem geschützten Zustande oder derart mit hochmolekularen organischen Verbindungen vergesellschaftet vorfindet, dass sie nicht wasserlöslich ist".

[1]) Siehe z. B. bezüglich Torula-Arten Will, Zbt. Bakt. (2) 21, 386, 459; 1908 und 34 1; 1912.

[2]) Willstätter und Steibelt, H. 115, 211; 1921.

[3]) Willstätter und Racke, Lieb. Ann. 425, 1; 1921.

Nr.	Hefe	Zellenzahl per g Trokkengewicht	t	ccm	Rohrzucker g	Rohrzucker %	g	% Trokkeng.	Abs. Zellenzahl	k	Inv. (Mittel)
1.	Unterhefe H.	$0,16 \cdot 10^{11}$	17°	20—60	4—10	8—16	0,1—0,5	30	$0,05—0,65 \cdot 10^{10}$	$20—125 \cdot 10^{-4}$	$10 \cdot 10^{-12}$
2a.	Brennerei-Oberh. SB	$0,30 \cdot 10^{11}$	17°	60—100	5—10	8—10	0,2—1	30	$0,1—0,26 \cdot 10^{10}$	$7—27 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-12}$
2b.	„ R	$0,26 \cdot 10^{11}$	17°	60	4,8	8	0,3—0,4	25	$0,23—0,26 \cdot 10^{10}$	$35—46 \cdot 10^{-4}$	$8,5 \cdot 10^{-12}$
3.	Brau.-Oberh. Grönw.	—	17°	60	4,8	8	1 ccm Rohhefe		$0,24 \cdot 10^{10}$	$37,5 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-12}$
4.	Brauerei-Unterh. „	—	17°	60	4,8	8	1 ccm Rohhefe		$0,22 \cdot 10^{10}$	$59,5 \cdot 10^{-4}$	$13,0 \cdot 10^{-12}$
5.	Lab. Kultur S. ellips.	$0,47 \cdot 10^{11}$	30°	100	10	10	0,29	(30)	$1,36 \cdot 10^{10}$	$65 \cdot 10^{-4}$	$4,8 \cdot 10^{-12}$
6.	Torula Hansen (Svb.)	$2,5 \cdot 10^{11}$	18°	100	8	8	—	—	$31,5 \cdot 10^{10}$	$40 \cdot 10^{-4}$	$0,11 \cdot 10^{-12}$
7.	Sacch. thermantiton	—	17°	60	4,8	8	—	—	$2,9 \cdot 10^{9}$	$30 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-12}$
		—	19°	100	8	8	—	—	$2,8 \cdot 10^{9}$	$25 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-12}$
8.	Sacch. Marxianus	$0,72 \cdot 10^{11}$	17°	60	4,8	8	—	—	$0,76 \cdot 10^{10}$	$0,73 \cdot 10^{-7}$	$4,6 \cdot 10^{-14}$

2a 3 Eu Svanberg nd Laur 2b und Euler d Josephs

„Die Methode, durch enzymatische Abbauvorgänge die Saccharase frei und löslich zu machen, lässt sich so gestalten, dass die frische Hefe unverdünnt der langdauernden Autolyse überlassen wird (C. O'Sullivan und F. W. Tompson[1])), oder dass sie dabei unter mässiger Verdünnung mit Wasser der Wirkung eines antiseptischen und abtötenden Mittels unterworfen wird (C. S. Hudson[2]), rapid autolysis)."

„Die Hefeverflüssigung durch abtötende Mittel bewirkt an sich keine Abgabe des Enzyms an Wasser. Und je nach dem dabei angewandten Zellgift werden die enzymatischen Vorgänge verschieden geleitet, so dass . . . der chemische Apparat der Saccharasefreilegung entweder geschont (Toluol) oder geschädigt wird (Essigester); daher ist nur im ersteren Fall die durch Hefeverflüssigung beschleunigte Autolyse für die Saccharasegewinnung brauchbar."

Unter den angegebenen Methoden[3]) ist somit die beschleunigte Auto-

[1]) C. O'Sullivan und F. W. Tompson, Jl Chem. Soc. 57, 834; 1890.

[2]) C. S. Hudson und H. S. Paine, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 774; 1910. — C. S. Hudson, ebenda 36, 1566; 1914.

[3]) Nach Willstätter ist die Vorbereitung der Hefe für die Extraktion durch Trocknung wertlos, insoweit sie durch Koagulieren der Eiweissstoffe das Lösen der Saccharase erleichtern soll. „Trocknung der Hefe und darauffolgendes Ausziehen mit Wasser kann brauchbare Saccharaselösungen liefern, wenn Schädigungen (höheres Erwärmen, Verweilen in wasserhaltigem Alkohol) vermieden und das Ausziehen der Hefe, was beachtet werden sollte, unter Bedingungen des enzymatischen Abbaues und mit genügend grosser Zeitdauer vorgenommen wird."

lyse weitaus am günstigsten. C. S. Hudsons Vorschrift ist neuerdings von Willstätter und Racke eingehend untersucht und noch verbessert worden.

Folgende Arbeitsweisen kommen nunmehr in Betracht:

1. Verfahren von Hudson (rasche Autolyse bei Anwendung von Toluol).

Die frische Presshefe wird in das gleiche bis doppelte Gewicht Wasser eingetragen, mit 5—10% ihres Gewichtes an Toluol vermischt und nach kräftigem Durchschütteln, das man alle Tage wiederholt, bei Zimmertemperatur etwa 7 Tage der Autolyse überlassen. Nach wenigen Stunden setzt unter beträchtlicher Gasentwickelung Selbstgärung ein, die bis zum folgenden Tage beendet ist. Nach einer Woche filtriert man die Hefeflüssigkeit ab. Der abfiltrierte Auszug beträgt etwa 1400 ccm für 1 kg 20—22%iger Frischhefe (oder bei Anwendung von 2 Teilen Wasser 2100 ccm), d. i. ungefähr 80% der entstandenen Hefeflüssigkeit, und sein Trockengewicht 85—123 g. Den Zeitwert (vgl. S. 200) fanden Willstätter und Racke 160—206 bei Anwendung von Brauereihefen vom Zeitwert 230—350.

Bei der hierauf folgenden Behandlung der Saccharaselösung mit Bleiazetat zur Entfernung von Eiweisskörpern ist es zweckmässig, einen grösseren Bleiüberschuss zu vermeiden, indem man Tüpfelproben mit Schwefelammonium macht. Wenn die Flüssigkeit schon ein wenig Blei enthält, gibt sie zwar noch etwas mehr Fällung mit weiterem Bleiazetat, erfordert aber nur noch wenig davon. Der Eiweissniederschlag ist reichlich und gut filtrierbar. Das Filtrat gibt mit Schwefelwasserstoff nur ein wenig kolloides Bleisulfid, das mit spanischer Klärerde koaguliert und abfiltriert wird.

2. Verfahren der raschen Autolyse mit (Essigester +) Toluol unter Neutralisieren mit Ammoniak oder Ammonphosphat nach Willstätter und Racke.

Das Verfahren hat den Vorzug günstigerer Saccharaseausbeute und etwas grösserer Reinheitsgrade. Die Frischhefe wird nach dem Eintragen in das gleiche (oder doppelte) Gewicht Wasser durch Versetzen mit Toluol und Essigsäureester (je 50 ccm auf 1 kg) verflüssigt. Willstätter beginnt bald die auftretende Säure mit verdünntem Ammoniak zu neutralisieren und vervollständigt die Neutralisation in den ersten Stunden oft und weiterhin am ersten Tage noch einige Male. Die Auflösung der Saccharase erfordert 3—4 Tage. Um die Enzymlösung filtrierbar zu machen, muss man sie mit Essigsäure neutralisieren, wodurch ein sehr starker Eiweissniederschlag entsteht, und lässt noch eine Stunde lang stehen. Dann lassen sich ungefähr 1500 ccm (aus 1 kg Hefe mit gleichem Gewicht Wasser) abfiltrieren mit meistens grösserem Saccharasegehalt, als derjenige der Hefe war, und mit einem Trockengewicht von 57—85 g. Der Zeitwert einer solchen Lösung, auf Trockenrückstand bezogen, betrug 114—142. Die weitere Reinigung zeigt keinen Unterschied gegenüber dem Hudsonschen Verfahren. Durch die Fällung mit Bleiazetat verminderte sich das Trockengewicht auf 47 (in mehreren Beispielen), während sich der Zeitwert auf 70—90 verbesserte.

Die Anwendung von Ammoniumphosphat ist gleichmässiger, die Autolysenflüssigkeit in diesem Falle schon ohne Behandlung mit Essigsäure besonders gut filtrierbar, Reinheitsgrad und Saccharaseausbeute pflegen höher zu sein. Man verwendet für 1 kg Frischhefe 25 g $(NH_4)_2 HPO_4$. Die filtrierte Saccharaselösung wird entweder direkt mit Bleiazetat von Phosphorsäure und Proteinen befreit oder man fällt zuerst mit Magnesiumchlorid die Phosphorsäure aus und enteiweisst das Filtrat mit Bleizucker, in diesem Fall mit einer viel geringeren Menge.

Saccharaselösung aus Trockenhefe. Willstätter trocknet zwecks gleichmässigerer Verarbeitung zunächst die einzelnen Hefelieferungen an der Luft und vermischt sie dann. Die gemahlene Trockenhefe wird mit der zehnfachen Menge Wasser und der ihr gleichen oder halben Menge Toluol vermischt und 2—3 Tage bei Zimmertemperatur gerührt oder an der Maschine geschüttelt. Auch bei der entwässerten Hefe bezeichnet Willstätter die Neutralisation als eine Verbesserung und Abkürzung des Verfahrens.

3. Rasche Autolyse mit Essigester und Toluol ohne Neutralisation. Im hiesigen Laboratorium hat sich folgendes einfache Verfahren bewährt: Die frische eventuell durch Gärung vorbehandelte Hefe (80 % Wassergehalt) wird mit Toluol und dem von Willstätter vorgeschlagenen Essigester (sowie eventuell mit NaCl) während 4 Tagen verflüssigt. Filtration durch viele Faltenfilter. Ausgehend von Hefe vom mittleren Zeitwert 250 gelangen wir zu einem Saft $\pm 0 = 110$ bis 120, also If $= 0{,}4$, wobei etwa 70 % des Gesamtsaccharasegehaltes der Hefe gewonnen werden. Von der Bleiazetatfällung sind wir abgegangen, da sie keinen besonderen Vorteil zu bieten scheint.

Allgemeines über Reinigung der Saccharasepräparate.

1. Verfolgung der Reinigungsarbeit. Sowohl beim Ausarbeiten von Reinigungsverfahren als bei der Reinigung von Lösungen zu präparativen Zwecken ist es unerlässlich, die Wirksamkeit der Substanz per Gewichtseinheit ständig zu verfolgen. Die Masseinheiten der Saccharase findet man S. 200 u. ff. ausführlich besprochen, nämlich den „Zeitwert" nach O'Sullivan und Tompson, die „Inversionsfähigkeit" nach Verf. und Svanberg, sowie den „Menge-Zeit-Quotienten", M. Q. Z. nach Willstätter.

Reinigung durch Adsorption. Verf. und Kullberg[1]) haben nach der Bleiazetatbehandlung die weitere Reinigung mit Kaolin vorgenommen, da, wie Michaelis[2]) gefunden hatte, Kaolin zwar Proteine, nicht aber Saccharase adsorbiert.

Hinsichtlich des Verhaltens von Kaolin zu Saccharase haben neuerdings Willstätter und Racke (l. c.) die wichtige Beobachtung gemacht, dass zwar unreine Saccharase tatsächlich von Kaolin nicht adsorbiert wird, während bei höheren Reinheitsgraden das Enzym von Kaolin gebunden wird.

[1]) Euler und Kullberg, H. 73, 335; 1911.
[2]) Michaelis, Biochem. Zs 7, 488; 1907.

Dass die erste Behandlung von Saccharaselösungen, auch von solchen, welche durch rasche Autolyse nach Hudson dargestellt sind, ohne Verlust von Saccharase möglich ist, wird von Willstätter bestätigt. Aber diese Behandlung fand Willstätter ungenügend.

Wie der genannte Forscher betont, liegen die Enzyme nicht als reine Stoffe vor. „Man findet sie in den . . . Auszügen mit einem grossen Vielfachen komplizierter organischer Verbindungen vergesellschaftet, nicht einfach im Zustand eines Gemisches, sondern durch Kräfte verbunden, wie sie auch in den Adsorptionsverbindungen mit unlöslichen Adsorbentien wirken.“ Die Begleitstoffe der Saccharase in den Hefenauszügen sind ihrer Zusammensetzung nach durchaus nicht konstant, sondern man kann die Autolyse des Pilzprotoplasmas verschieden leiten, so dass die Natur der amphoteren Stoffe aus der Klasse der Proteine und Proteinabbauprodukte ungemein schwankt. Davon ist das Verhalten gegen Adsorbentien und im Adsorbate abhängig. „Daher sagt die Adsorptionsanalyse oder die elektrische Überführung über die Natur eines Fermentes nichts aus, sondern sie lässt nur erkennen, ob in dem aus einem Ferment und seinen jeweiligen Begleitstoffen gebildeten Additions- oder Adsorptionsprodukt die Säure- oder Basennatur überwiegt.“

Einen gewissen Erfolg hinsichtlich der selektiven Adsorption hatte Kullberg[1]) mit kolloider Eisenlösung erzielt; indessen blieb die Ausbeute bei seinen Vorversuchen gering. Als diese Versuche im hiesigen Laboratorium sowohl mit kolloider Eisenlösung als mit Aluminiumhydrat wieder aufgenommen werden sollten, hat die Methode in den Händen von Svanberg[2]) zu keinem Erfolg geführt. Dagegen ist es Willstätter und Racke gelungen, gerade durch die Anwendung von Aluminiumhydroxyd wesentliche Fortschritte in der Reinigung von Saccharaselösungen zu erzielen. Die genannten Forscher fanden, ausgehend von Willstätters Erfahrungen an Peroxydasen, dass die Adsorption der Saccharase vervollkommnet wird, wenn man ein Lösungsmittelgemisch, besonders wässerig-azetonige Lösungen, anwendet. „Mit dreimal weniger Adsorbens entstehen Adsorbate, in denen das Verhältnis von Invertin zum Trockenrückstand dreimal günstiger ist als bei der Adsorption aus wässeriger Lösung.“

Auch über die Zerlegung von Adsorbaten haben Willstätter und Racke wesentliche Tatsachen gefunden; sie bezeichnen die Zerlegung der Adsorbate als „Elution“; diese beruht „auf der Überwindung der kleinen Affinitätsbeträge, die in den Adsorbaten wirken, durch etwas stärkere Affinitäten“. Diese Elution ist ihnen in zweierlei Weise gelungen, nämlich einerseits durch schwache Alkalien, besonders Ammoniak von 0,01—0,1 % bzw. sekundäre Alkaliphosphate, andererseits durch Rohrzucker.

[1]) Euler und Kullberg, H. 73, 335; 1911.
[2]) Euler und Svanberg, H. 107, 269; 290; 1919.

„Die Zusammensetzung und demzufolge das Verhalten der Adsorbate ist von den Bedingungen ihrer Bildung abhängig. Wenn das Invertin aus dem wässerigen Hefeauszug bei Gegenwart von Ammoniak adsorbiert wird, ... so verhält sich das Adsorbat anders als nach der Darstellung aus ammoniakfreier, am besten azetonhaltiger Lösung. Das Invertin ist im ersteren Falle aus dem Adsorbat gar nicht durch Ammoniak eluierbar. Dem Adsorbat fehlen entweder Stoffe, die beim Eluieren mitwirken, oder es enthält zusammen mit dem Invertin Stoffe, die es fester an das Aluminiumhydroxyd binden."

Begleitstoffe beider Art kommen in den Adsorbaten vor; Willstätter unterscheidet sie als „Koadsorbientien" und „Koeluentien".

Zur Deutung der gefundenen Tatsachen nimmt Willstätter an, dass das Adsorbendum an das Adsorbens sowohl unmittelbar gebunden, wie auch durch Vermittlung eines Koadsorbens gebunden auftritt; die verschiedenen Fälle werden durch folgende Formeln zum Ausdruck gebracht:

I. Enzym ⟨ Koadsorbens ···· Adsorbens / Koeluens
(eluierbar durch Ammoniak)

II.
Enzym ···· Koadsorbens ···· Adsorbens
(nicht eluierbar durch Ammoniak)

III.
Enzym ···· Adsorbens
eluierbar durch Ammoniak)

In diesem Zusammenhang möge hier

das Verhalten der Saccharase zu Sorptionsmitteln

näher beschrieben werden.

Bei der Sorption von Enzymen an festen Oberflächen handelt es sich, wie im I. Teil, S. 80 u. ff. betont wurde, im allgemeinen um chemische Reaktionen. Vermutlich werden dabei schwach saure oder schwach basische Gruppen des Enzympräparates neutralisiert. Über solche Oberflächenreaktionen zwischen chemisch definierten Stoffen ist noch wenig bekannt, so dass die Anwendungen der Sorption zur Reinigung von Saccharaselösungen noch rein empirisch sind. Wegen der allgemeinen Bedeutung der Sorptionsvorgänge für die Enzymchemie gehen wir hier näher auf die besonders durch Willstätter bekannt gewordenen Tatsachen ein.

Allgemeines.

Wirksamkeit des Enzyms im Adsorbat. Michaelis[1]) hat zuerst nachgewiesen, dass die Saccharase im Zustand der Adsorptionsverbindung noch wirksam ist. Dieses Ergebnis konnte sowohl Verf. als Willstätter durchaus bestätigen.

In den Adsorbaten ist die Saccharase nach Willstätters Befund

[1]) Michaelis, Biochem. Zs 7, 488; 1907/08.

meistens weniger beständig als in Lösung und es ist ungleichmässig beständig. Siehe auch S. 192.

Adsorptionswert. Das Adsorptionsvermögen eines Adsorptionsmittels für Saccharase kann man nach Willstätter durch den „Adsorptionswert" ausdrücken.

„Adsorptionswert" ist die Menge Rohrzucker in Gramm, die in 16%iger Lösung, enthaltend 1% NaH_2PO_4, von 1 g des unter bestimmten Bedingungen mit Saccharase gesättigten Adsorbens bei 15,5° in 1 Minute zur Nulldrehung invertiert wird.

Willstätter gibt für die Sorption an $Al(OH)_3$ folgendes Beispiel an (l. c. S. 67): Von der mit Saccharase gesättigten Aluminiumhydroxydsuspension wirkten 2,5 ccm, enthaltend 0,0638 g $Al(OH)_3$, auf 4 g Rohrzucker unter den Bedingungen der Zeitwertdefinition. Da gemäss der gefundenen Nulldrehungszeit von 35 Minuten für 1 g Aluminiumhydroxyd 35 · 0,0638 Minuten nötig wären, um 4 g Rohrzucker zu 75,75% zu spalten, so würden in 1 Minute $\frac{4}{35 \cdot 0,0638} = 1,787$ g Zucker auf 0° invertiert.

Hält man sich an die Aktivität der Enzymlösung vor und nach der Sorption, was gewisse Vorteile bietet, so kann man die Inversionseinheiten (gemessen durch die Inversionskonstanten k) angeben, welche durch 1 g Sorbens unter gegebenen Bedingungen aus der Lösung entfernt werden.

Die wichtigsten Sorptionsmittel.

1. Metallhydroxyde. Das angewandte Aluminiumhydroxyd wird aus reinem Aluminiumsulfat oder Ammonalaun dargestellt[1]). Die siedende Lösung des Aluminiumsalzes wurde in dünnem Strahl in 15%iges Ammoniak eingetragen, das im Emailtopf durch Einleiten von Dampf erhitzt und weiter mindestens 1 Tag im Kochen erhalten wurde. Wenn nach dem Auswaschen durch Dekantieren, was 1 Woche zu dauern pflegt, mit Nesslers Reagens keine Färbung mehr entsteht, so bildet das Aluminiumhydroxyd eine zähe, plastische Masse, und verteilt sich zum Teil kolloidal. Das Adsorbens ist dann gut brauchbar, selbst wenn es noch Spuren von SO_4-Ion enthält. Um auch diese noch zu entfernen, muss man ein zweites Mal mit Ammoniak erhitzen und dies, da man nicht mehr dekantieren kann, so lange fortsetzen, bis die Flüssigkeit ammoniakfrei ist. Das so dargestellte Hydroxyd erwies sich erheblich wirksamer als Handelspräparate.

Zur Trennung der Saccharase von Verunreinigungen hat es sich in Willstätters Untersuchungen als zweckmässig erwiesen, die Sorption nicht in Wasser, sondern in wässrig-alkoholischer oder noch besser in wässrig-azetonischer Lösung vorzunehmen. Mit dreimal weniger Adsorbens entstehen Adsorbate, in denen das Verhältnis der Saccharase zum Trockenrückstand dreimal günstiger ist als bei der Adsorption aus wässriger Lösung.

[1]) Siehe hierzu auch Willstätter, Lieb. Ann. 422, 47 u. zw. 72; 1920/21.

Ferner wurde die Erfahrung gemacht, dass eine bestimmte Sorte Aluminiumhydroxyd unter verschiedenen Bedingungen, z. B. in wässriger oder azetonig-wässriger Lösung ungefähr gleiche Stoffmengen, aber verschiedene Mengen Enzym adsorbiert. Daher wird die Saccharase in desto reinerem Zustand erhalten, je weniger Aluminiumhydroxyd man braucht, um eine gegebene Menge desselben zu adsorbieren.

Die Adsorption wurde von Willstätter gewöhnlich bei schwach saurer Reaktion der Saccharaselösung vorgenommen.

Eine Versuchsreihe von Myrbäck mit einer Saccharaselösung vom If-Wert 7 ergab bezüglich des Aziditätseinflusses folgende Zahlen (10 ccm Enzymlösung + 0,009 g $Al(OH)_3$ in 3 ccm):

pH	3,25	3,75	4,45	6,25	7,7	ca. 9
% adsorb. Saccharase . .	30	46	78	89,3	71	46,5

Es zeigte sich also ein ausgesprochenes pH-Maximum der Aktivität bei etwa 6.

Im angeführten Versuch würden von 0,01 g $Al(OH)_3$ aus der untersuchten Lösung etwa 0,014 Inversionseinheiten adsorbiert werden können.

Elution.

Dass Rohrzucker eine besondere eluierende Fähigkeit besitzt, wurde von O. Meyerhof[1]) entdeckt, welcher Saccharase aus seiner Verbindung mit Eisenhydroxyd dureh Rohrzuckerlösung freimachen konnte. Es scheint aber nach den Studien von Willstätter[2]) und Michaelis[3]), dass die ablösende Wirkung des Rohrzuckers nicht streng spezifisch ist und ferner, dass keineswegs ein Enzym allgemein von seinem Substrat eluiert wird.

Elution mit verschiedenen Mitteln. Das Adsorbat von Saccharase an Aluminiumhydroxyd gibt an reines Wasser kein Enzym ab, auch nicht an kohlensäurehaltiges und mit Essigsäure angesäuertes. Eluentien sind in erster Linie Rohrzucker, der das Adsorbat quantitativ zerlegt. In zweiter Linie schwache oder sehr verdünnte Basen, am besten schwach alkalisch reagierende Salze, welche einen pH-Wert von etwa 8—10 und eine erhebliche potentielle Alkalinität erzeugen, besonders sekundäre Alkaliphosphate. Am vollständigsten eluiert eine Lösung, welche Rohrzucker und Phosphatpuffer enthält.

Die Affinität des Rohrzuckers zur Saccharase geht aus kinetischen Tatsachen hervor; auch bei den von Hedelius[4]) ausgeführten Diffusionsversuchen bestand die Absicht, sie in Erscheinung treten zu lassen.

Die Elution der Adsorbate fällt verschieden aus, je nach den Bildungsbedingungen der Adsorbate und je nach der Entstehung der Saccharaselösung;

---

[1]) Meyerhof, Pflüg. Arch, 157, 251; 1914.
[2]) Willstätter und Racke l. c. — Willstätter und Kuhn, H. 116, 53; 1921.
[3]) Michaelis, Biochem. Zs 115, 269; 1921.
[4]) Euler und Hedelius, H. 110, 190; 1920.

wegen der Einzelheiten muss auf die Originalarbeit verwiesen werden. Die Begleitstoffe der Saccharase wirken bei ihrer Sorption und noch viel mehr bei der Elution aus dem Adsorbate mit, wie bereits bei der Beschreibung des Reinigungsverfahrens erwähnt wurde (Willstätter).

$Cu(OH)_2$. Kupferionen üben auf Saccharase eine verhältnismässig schwache Giftwirkung aus[1]), welche durch H_2S vollständig aufgehoben werden kann. Die Sorption von Saccharase an $Cu(OH)_2$ versprach den Vorteil, dass das Adsorbens sich (durch Schwefelwasserstoff) aus der Lösung entfernen lässt, wodurch das langwierige Elutionsverfahren vermieden würde. Indessen wird Saccharase auch durch CuS zurückgehalten.

Auch Versuche, frischgefälltes HgO als Sorbens zu verwenden[2]) haben bis jetzt zu keinem brauchbaren Resultat geführt.

2. Kaolin. Das fein verteilte Handelspräparat wird geeignet einige Stunden in 20%iger Salzsäure ausgekocht und dann bis zum Verschwinden der Chlorreaktion mit destilliertem Wasser ausgewaschen.

Die aus dem Tonerdeadsorbat eluierte Saccharase, und zwar erst diese, ist adsorbierbar durch Kaolin. Durch die Behandlung mit Aluminiumhydroxyd ist das Enzym von den Koadsorbentien abgetrennt worden, mit denen es zuvor assoziiert war. Es zeigt in diesem Reinheitsgrad das Verhalten eines amphoteren Stoffes und wird nun sowohl von elektronegativen wie elektropositiven Adsorbentien aufgenommen (Willstätter).

Es ist nicht nötig, die Adsorption wie beim Aluminiumhydroxyd durch Beimischung von Azeton oder Alkohol zu befördern; die Saccharase ist auch schon so arm an Schutzstoffen, dass sie in den organischen Lösungsmitteln rasch verderben würde. Die Sorptionsfähigkeit des Kaolins für Saccharase geht aus folgendem Versuch von Willstätter und Racke hervor:

Lösung (mit NH_3 dargestellt und einige Tage dialysiert, neutrale Reaktion M.Z.Q. 0,7; enthält 0,25 g Trockensubstanz in 130 ccm), gab an 10 g Kaolin 84% der Saccharase ab und verlor auf weiteren Zusatz der gleichen Menge die Saccharase gänzlich.

Aus dem Kaolinadsorbat lässt sich die Saccharase durch sekundäres Alkaliphosphat, Natriumkarbonat oder Ammoniak eluieren, am besten durch Suspendieren des Adsorbates in Wasser und Versetzen mit so viel 0,2 n-Sodalösung, bis die Flüssigkeit alkalisch zu reagieren beginnt. Das Kaolin wird dabei zum Teil kolloid und die Elution ist kaum filtrierbar. Die Klärung wird erreicht, indem man die Hauptmenge des Kaolins mit der Zentrifuge abtrennt und die trübe Elution auf der Nutsche durch eine Schicht von geglühtem Kieselgur absaugt. Dabei tritt kein Verlust an Saccharase ein. Die Ausbeuten leiden, wenn die Kaolinadsorbate nicht rasch genug verarbeitet werden, da das Enzym in ihnen allmählich in unwirksame Form übergeht.

[1]) Euler und Svanberg, Fermentf. 4, 90; 1920.
[2]) Euler und Svanberg, H. 114, 137; 1921.

3. Kohle. Michaelis und Ehrenreich[1]) fanden, dass Saccharase von Kohle sowohl aus alkalischer als in neutraler oder saurer Lösung adsorbiert wird. Die Bindungsverhältnisse zwischen Saccharase und Kohle haben anschliessend hieran A. Eriksson[2]) sowie Nelson und Griffin[3]) untersucht. Was die gefundenen quantitativen Beziehungen betrifft, so bleibt abzuwarten, ob sich dieselben für reinere Enzymlösungen bestätigen.

Bemerkenswert ist Erikssons Angabe, dass er eine bedeutende Elution der Saccharase durch Rohrzucker erzielt hat. Die abweichenden Resultate von Nelson und Griffin können wohl durch Verschiedenheiten der in der Lösung in grossen Mengen vorhandenen Verunreinigungen veranlasst sein.

Organische Sorptionsmittel. Mastix ist nach Michaelis und nach Willstätters Befunden unwirksam. Die Sorption der Saccharase durch Kollodium ist bei der Verwendung von Kollodiumsäcken zur Dialyse sehr hinderlich. Einige Versuche von Myrbäck haben folgende Resultate ergeben:

1. Eine rohrzuckerhaltige Saccharaselösung (Zeitwert rund 5 Min.) ergab eine Inversionskonstante $k \cdot 10^4 = 38$. In 50 ccm dieser Lösung wurde ein frisch hergestellter Kollodiumschlauch gewöhnlicher Grösse (Gesamtoberfläche beider Seiten 175 qcm) in zerschnittenem Zustand suspendiert. Nach etwa 12 Stunden war die Inversionskonstante $k \cdot 10^4$ auf 18 gesunken; sie änderte sich dann nur wenig, nämlich in einem Tag auf 17. Wurde nun aber in der so behandelten Enzymlösung ein neuer Kollodiumschlauch gleicher Grösse suspendiert, so trat offenbar keine Sorption mehr ein; nach 24 Stunden war $k \cdot 10^4 = 17$.

2. Ein Kollodiumschlauch, welcher zur Dialyse von Saccharaselösung bereits angewandt worden war, wurde in 50 ccm einer Enzymlösung wie die unter 1 beschriebene suspendiert. Innerhalb 24 Stunden sank $k \cdot 10^4$ von 38 auf 30, nach weiteren 24 Stunden auf 26 (offenbar durch Sorption an der Aussenseite). Diese Lösung, mit einem neuen Kollodiumschlauch 1 Tag stehen gelassen, ergab innerhalb der Versuchsfehler die gleiche Konstante, $k \cdot 10^4 = 27$.

Es scheint, dass Saccharase in gereinigtem Zustand nicht sorbiert wird, sondern nur dann, wenn sie mit fremden sorbierbaren Gruppen (Koadsorbentien nach Willstätter) behaftet ist.

Im folgenden werden einige Beispiele angegeben, welche zeigen, in welcher Weise Willstätter und Racke die Tonerde-Sorption anwenden.

Das Ausgangsmaterial war ein durch rasche Autolyse unter Toluolzusatz (1 Tl. Hefe, 2 Tle. Wasser) gewonnener Hefeauszug vom Zeitwert 250 (auf

[1]) Michaelis und Ehrenreich, Biochem. Zs 10, 283; 1908.
[2]) Eriksson, H. 72, 313; 1911.
[3]) J. M. Nelson und Griffin, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1109; 1916.

die Hefe bezogen). 14,75 l wurden mit 5,9 l, d. h. 40% Azeton vermischt und mit 1,5 kg gemahlenem Kaolin einige Minuten verrührt und über Nacht stehen gelassen. Dann konnte ein grosser Teil der Flüssigkeit abgehebert werden, der Rest wurde filtriert. Hierbei gingen 10% der Saccharase verloren. Vom Filtrat (16 l) diente ein Anteil von 2,7 l zur Bestimmung der Tonerdemenge, die für die Adsorption von etwa 90% der Saccharase erforderlich war, und die Hauptmenge (13,5 l; M.Z.Q. 52,3) wurde dann in fünf ebenso grossen Anteilen mit Aluminiumhydroxyd bearbeitet. Von 8,3 g Aluminiumhydroxyd wurden in der Vorprobe 71% der Saccharase adsorbiert; danach war vom Adsorbens etwa 20% mehr anzuwenden. Die 5 Portionen wurden mit Aluminiumhydroxydsuspension, jede 10,7 g $Al(OH)_3$ enthaltend, in dünnem Strahl unter ständigem Umschütteln versetzt und eine halbe Stunde stehen gelassen. Das Adsorbens nahm nun 88% der Saccharase auf.

Vom Adsorbat lässt sich die Mutterlauge zum grossen Teil dekantieren. Die übrig bleibende Suspension (4 l) wurde verarbeitet in einer Zentrifuge von 2 l Gläserinhalt. In den Zentrifugengläsern wurde das gesammelte Adsorbat dreimal gewaschen durch Anrühren mit destilliertem Wasser und erneutes Zentrifugieren. Das in einen Kolben übergespülte Tonerdeadsorbat, dessen Suspension 1700 ccm betrug, wurde unter kräftigem Schütteln mit 5½ ccm 10%igem Ammoniak versetzt. Die rasch gebildete Elution wurde zum Teil auf einige Nutschen gegeben und auf gehärtetem Filtrierpapier abgesaugt, zum Teil in der Zentrifuge annähernd geklärt und auf die nämlichen Filter nachgefüllt, da die ammoniakalische Elution durch Zentrifugieren allein nicht klar erhalten und danach für sich allein nicht klar filtriert werden konnte. Auch das fast wasserklare Filtrat pflegte noch etwas kolloides Aluminiumhydroxyd zu enthalten, das erst bei starkem Einengen ausflockte. Die Arbeit muss so geleitet werden, dass man in einem Tage bis zum Absaugen der Hauptmenge der Elution kommt, wenn auch nicht mehr zum Nachwaschen auf der Nutsche.

Man kann die Saccharase auch quantitativ mit Aluminiumhydroxyd adsorbieren, aber dieses Verfahren führt nicht ebenso sicher zu den hohen Reinheitsgraden des Enzyms.

Verarbeitung gealterter Autolysenflüssigkeit. Besonders einfach und günstig gestaltete sich die Verarbeitung von Hefeauszügen, die lange Zeit aufbewahrt wurden. Die Fortdauer proteolytischer Vorgänge scheint zu bewirken, dass der Hefeauszug an Begleitstoffen, die der Saccharase anhaften, namentlich an höheren Proteinen, ärmer wird. Solche gealterte Autolysenflüssigkeit bedarf keiner Vorbehandlung mit Kaolin.

10 l eines 7 Monate alten Hefenauszuges vom Zeitwert 400 wurden mit 4 l Azeton vermischt, wobei ungewöhnlich wenig Eiweissfällung auftrat, und nach dem Filtrieren mit Aluminiumhydroxyd behandelt. Hier genügte ⅓ der gewöhnlich für ebensoviel Saccharase anzuwendenden Menge, nämlich 11,3 g, zum quantitativen Adsorbieren der Saccharase. Die ammoniakalische

Elution enthielt nach dem Einengen etwa 40%, aber das mit Azeton gefällte und getrocknete Präparat nur noch etwa 25% von der Saccharase des Hefeauszugs. Die Ausbeute betrug 0,426 g, der Zeitwert (nach der teilweisen Zersetzung) 1,0.

Adsorption mit Kaolin.

Die Saccharase in der ammoniakalischen Elution aus dem Tonerdeadsorbat wird von Kaolin vollständig aufgenommen. Die erforderliche Kaolinmenge ist aber weit geringer, und der Reinheitsgrad des Enzyms lässt sich höher steigern, wenn zuerst die Elution eingeengt und mit Azeton gefällt wird. Der Adsorption mit Kaolin wird die Saccharase am besten in schwach essigsaurer Lösung unterzogen.

Es wurden 3,83 g Saccharase vom Zeitwert 4,8 (M.Z.Q. 16,3) verarbeitet. Das Präparat wurde mit wenig Wasser angerieben und in 100 ccm gelöst. Die trübe Flüssigkeit gab nach Filtrieren auf Zusatz von 2,5 ccm 2 n-Essigsäure, und noch mehr beim Stehen, flockige Niederschläge, die starke Xanthoproteinreaktion zeigten. Nach wiederholtem Filtrieren enthielt die Lösung noch 8% der angewandten Saccharase (M.Z.Q. 13,6). Nach Verdünnen auf 800 ccm wurde mit 83 g Kaolin (vorbehandelt mit kochender Salzsäure) vollständige Adsorption erzielt. Das Adsorbat wurde sogleich in der Zentrifuge von der Mutterlauge getrennt, worin hauptsächlich Hefegummi zurückblieb, und mehrmals mit Wasser gewaschen. Hierauf wurde es mit 1 l Wasser suspendiert und unter Schütteln wurden 11 ccm 0,2 n-Sodalösung bis zur eben beginnenden alkalischen Reaktion zugefügt. Das Natriumkarbonat wird vom Kaolin aufgenommen, das dabei das adsorbierte Enzym freigibt. Die vom Kaolin abzentrifugierte Lösung war ganz trüb; sie wurde durch Schütteln mit 50—100 g Kieselgur klar und ohne Verlust filtrierbar. Die Elution enthielt 68% (M.Z.Q. 9,25) von der angewandten Saccharase (der filtrierten Lösung) und ihr Gehalt blieb bei den folgenden Operationen, Eindampfen und Dialyse, konstant, was sonst nicht der Fall war.

Die mit Essigsäure ganz schwach angesäuerte Elution wurde im Faust-Heimschen Trockenapparat auf 300 ccm eingeengt und von dem dabei auftretenden Niederschlag unter Zusatz von Kieselgur abfiltriert.

Nach dreitägiger Dialyse durch Fischblasen betrug M.Z.Q. der Lösung wieder 9,25.

Wurde die Lösung nun im Faust-Heim-Apparat zur Trockne eingedampft, so erhielt man die Saccharase als eine spröde, pulverisierbare Masse, vom Zeitwert 0,86.

Willstätters Elutionsausbeute war in anderen Fällen weniger günstig. 17,62 g Saccharase vom Zeitwert 4,7 bildeten mit 270 g Kaolin das Adsorbat, welches mit 1,8 l Wasser unter Zusatz von 80 ccm 0,2 n-Natriumkarbonat eluiert wurde. Die mit Kieselgur geklärte, auf Lackmus neutral reagierende

Elution (M.Z.Q. 30) enthielt 40% der Saccharase, die beim Einengen und mehrtägigem Stehen auf 31% (M.Z.Q. 23) zurückging. Von da an war das Enzym beständig, auch bei sehr langem Stehen seiner Lösung.

Vorschrift zur Reinigung von Saccharase-Lösungen und Präparaten.

Die folgende Anleitung zur Reinigung stützt sich im wesentlichen auf die Angaben von Willstätter und Racke und die Erfahrungen aus dem hiesigen Laboratorium.

Es ist bereits auf Seite 173 erwähnt worden, dass die schnelle Autolyse unter Zusatz von Toluol und Essigester sehr wirksame Säfte liefert; wir kommen mit unserer Stockholmer Hefe in der Regel auf Säfte vom Zeitwert 110—120, also If = 0,4.

Die von Hudson und früher auch im hiesigen Laboratorium angewandte Reinigung durch Bleiacetat ist nach unseren Erfahrungen nicht erforderlich; man kann diese Manipulation einsparen, ohne dass sich der Gang und Erfolg der späteren Reinigung dadurch ändert.

Manchmal wurde der frische Autolysesaft mit guter Tierkohle behandelt (G. Ericson) und zwar mit 10—12 g Kohle auf 100 ccm Saft. Dann stieg If von 0,35 auf 0,45; bei schlechten Autolysesäften war der Effekt grösser.

Im allgemeinen besteht die erste Operation unseres Reinigungsverfahrens in einer

1. Alkohol-Fällung. In 96 prozentigen Alkohol wird unter Umrühren und Abkühlen das gleiche Volumen, beispielsweise 5 Liter Autolysesaft eingetragen. Die ziemlich starke Fällung wird nach etwa $^1/_2$ Stunde durch Dekantieren und Filtrieren entfernt. Das Filtrat enthält so gut wie keine Saccharase.

Die Fällung, welche 90—95% vom Saccharasegehalt S des Autolysesaftes enthält, wird in 2,5 Liter entweder reinen Wassers oder 20prozentigen Alkohols aufgeschlämmt, einige Stunden lang geschüttelt und dann filtriert.

Es werden ungefähr 90% der ursprünglichen Saccharasemenge S zurückgewonnen.

Durch Fäulnisbakterien kann das Eiweiss der Alkoholfällung teilweise entfernt werden (Gösta Ericson).

Der Vorteil dieser einleitenden Alkoholfällung besteht besonders darin, dass die folgende Adsorption mit weniger Tonerde ausgeführt und das Adsorbat leichter durch Filtration von der Lösung getrennt werden kann.

Die Lösung versetzen wir nun unter Abkühlen mit 20—35% Alkohol, wodurch das Gesamtvolumen also auf etwa 3,3 Liter steigt.

2. Tonerde-Sorption. Von dem nach Willstätter und Racke bereiteten Aluminiumhydroxyd verwenden wir per Liter Saccharaselösung 15—20 g in $^1/_2$ Liter suspendiert, also in unserem Beispiel 45—60 g in etwa 1,5 Liter Wasser. Die Sorption verläuft während etwa $^1/_2$ stündigen Umrührens

der Mischung. Hierauf wird dekantiert und unter Saugen filtriert. Das Adsorbat wird mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen. Bei Anwendung der obigen Tonerdemengen sind die Sorptionsverluste gering, die Fällung enthält noch rund 90 % von S.

3. Zur Elution dieses Sorbates verwenden wir 2 l 10—15prozentige Rohrzuckerlösung, welche 1% primäres Phosphat enthält. Nach einstündigem Schütteln wird filtriert, was durch Zusatz von Filtrierpapier erleichtert wird. Das Filtrat enthält nun noch 70—80% von S, bei einzelnen Versuchen 90%.

4. Erste Dialyse. Die Verluste, welche durch die hierauf folgende Dialyse eintreten, sind stark abhängig vom Material der Dialysierschläuche. Mit Kollodiummembranen konnten manchmal grössere Verluste vermieden werden. Der Zeitwert der sich nun ergebenden Lösungen schwankte zwischen 2 und 7 Min., If demgemäss zwischen 6 und 25. War die Reinigung mit Alkoholfällung eingeleitet worden, so wurden hier im allgemeinen günstigere Werte erhalten.

5. Kaolinsorption. Das Volumen der Saccharaselösung betrug nun rund 2 Liter. Nach Willstätters Vorschrift wird nun mit Essigsäure angesäuert, worauf etwa 75 g Koalin eingerührt werden und mit der Lösung etwa ½ Stunde unter Schütteln in Berührung bleiben. Das Kaolinsorbat wird nun durch Dekantieren und Zentrifugieren von der Lösung befreit und hierauf mit Wasser gewaschen.

6. Zweite Elution. Das Kaolin-Sorbat wird in etwa 500 ccm Wasser suspendiert, welches danach durch Soda oder Ammoniak auf pH = 9 gebracht wird und während 1 Stunde digeriert. Die hierauf folgende Scheidung wird durch Zentrifugieren und Filtrieren unter Zusatz von Kieselgur erreicht.

Die Verluste, welche durch diese letztere Operation entstehen, sind verhältnismässig sehr gross; die Lösung zeigt nämlich nunmehr nur 25—40% der Saccharasewirkung, welche vor der Kaolinbehandlung nachweisbar war und etwa 10—15% der Saccharasewirkung des ursprünglichen Autolysesaftes.

7. Zweite Dialyse. Durch die nachfolgende Dialyse werden Lösungen vom Zeitwert 0,6—1,0 oder If = 45—75 erhalten.

8. Zweite Tonerde-Sorption. Ist im Verlaufe des angegebenen Verfahrens die Reinigung weniger vollständig ausgefallen, so dass nach der zweiten Dialyse der Zeitwert etwa 1,0 beträgt, so kann das Resultat durch eine zweite Tonerdebehandlung verbessert werden. Man wendet dann geeignet etwa 1 g Tonerde an.

Ausfällung und Darstellung fester Saccharase-Präparate.

Willstätter und Racke fällen ihre eingeengten Enzymlösungen mit Azeton. 40 ccm Lösung wurden unter Umrühren bei 0° mit dem gleichen Volumen von eiskaltem Azeton gefällt, in einer rasch an- und auslaufenden Zentrifuge von der Mutterlauge getrennt und mit eiskaltem Azeton wieder in

der Zentrifuge gewaschen. Diese Behandlung mit Azeton sollte nicht länger als etwa 5 Minuten dauern. Man brachte die bräunliche, krümmelige Füllung rasch in den Exsikkator und evakuierte mit der Hochvakuumpumpe. Die Bestimmungen des getrockneten Präparates, 2,367 g vom Zeitwerte 2,34, ergaben einen weiteren Rückgang der Ausbeute auf 38,6% (M Z.Q. 20,3).

In einigen Beispielen blieb die Ausbeute von der Gewinnung der Elution an bis zum trockenen Präparat konstant, häufiger traten aber, namentlich beim Fällen mit Azeton, Enzymverluste auf, die besonders bei den besten Präparaten die Ausbeute und den Reinheitsgrad erheblich beeinflussten. Dennoch war die Fällung mit Azeton nicht zu entbehren, bei welcher viel von den Begleitstoffen, beispielsweise $^3/_4$ der Menge des Invertinpräparates und noch mehr, in der Mutterlauge zurückblieb. Eine andere Verarbeitung desselben Hefeauszugs ergab 45% Ausbeute in der Elution (bezogen auf die Saccharase nach der Kaolinbehandlung) und lieferte ein Präparat vom Zeitwert 2,8. Eine weitere Autolysenflüssigkeit (13,5 l nach der Kaolinbehandlung) lieferte bei einer Ausbeute von 42% in der Elution 1,4 g Saccharase vom Zeitwert 2,4. In diesem Falle war beim Eindampfen kein Verlust, aber beim Fällen mit Azeton Rückgang auf 26,7% von der Saccharase des Hefeauszugs eingetreten.“

Die gleichen Autoren beschreiben (l. c. S. 101) die Herstellung eines trockenen Präparates vom Zeitwert 0,725.

Wenn bei einem solchen Präparat ein besonders günstiger Reinheitsgrad erzielt wurde, so ging damit geringere Beständigkeit Hand in Hand. 4,4 g Saccharase vom Zeitwert 2,57 (M.Z.Q. 34,2), aufgelöst in 2 l, angesäuert mit 20 ccm 2 n-Essigsäure und filtriert, erlitten eine Einbusse von etwa 6%. Die Adsorption mit 73 g Kaolin war quantitativ, die Elution mit 2 l Wasser unter Anwendung von 40 ccm 0,2 n-Sodalösung enthielt nach dem Filtrieren, Klären und Einengen auf 300 ccm (M.Z.Q. 15,3) 48% der angewandten Saccharase. In der bei zweitägiger Dialyse erhaltenen Saccharaselösung (M.Z.Q. nur noch 11,0), deren Trockenrückstand 0,368 g betrug, besass das Enzym den Zeitwert 0,67, während man ohne die Zersetzung bei der Dialyse 0,5 erreicht hätte. Ein Teil der Ausbeute, 0,227 g (M.Z.Q. 5,23) wurde wieder gelöst und weitere 9 Tage dialysiert, und zwar nun mit sehr geringem Verlust (M.Z.Q. 15,13). Darauf entsprach die Saccharase nach der Wirksamkeit der Lösung und ihrem Trockengewicht (0,142 g) dem Zeitwert 0,55. Bei abermaligem Abdampfen wurde indessen ein Präparat gewonnen, dessen Zeitwert wieder auf 0,85 angestiegen war.

Eigenschaften der best gereinigten Präparate.

Die Lösungen zeigen keine Eiweissreaktionen mehr, „nur eine Art von Xanthoproteinreaktion kommt nie zum Verschwinden“. Die Präparate bleiben beim Erhitzen in 0,3—1%iger Lösung mit Salpetersäure farblos, zeigen aber beim Übersättigen mit Alkali eine rein gelbe, nicht intensive Farbe.

Von Hefegummi sind die durch Kaolinadsorption gereinigten Präparate frei.

Die Saccharase aus Tonerdeadsorbat liefert eine phosphorreiche Asche, enthält Ammoniumsalze und zeigt beim Erhitzen schwache Pyrrolreaktion. Die reinsten Lösungen gaben weder mit Bleiessig noch Bleizucker, Quecksilberchlorid oder Uranylazetat Fällungen (Willstätter, Racke, l. c.).

Soweit sich die Erfahrungen aus dem Stockholmer Laboratorium erstrecken, können die Angaben von Willstätter und Racke durchaus bestätigt werden. Die Untersuchung hochgereinigter Präparate (If = 110 bis 70) durch K. Josephson (Arkiv f. Kemi, Bd. 8, 1922) hat bis jetzt folgendes ergeben:

Aschengehalt: 1—4 %.
Phosphorgehalt: 1—2 % P.
Hexosen: 60—20 %.
Pentosen nach der Orcinreaktion: Unter 5 %.
N nach Kjeldahl-Bang: 5—8 %.
Amino-N nach van Slyke: > 2 % (leicht abspaltbar ca. 1 %).

Die früheren Versuche, durch Diffussionsmessungen Anhaltspunkte über die Molekulargrösse bezw. den Dispersitätsgrad der Saccharase zu gewinnen, sind von Gösta Ericson[1]) mit reineren Präparaten (Zeitwerte 0,5—0,8) wiederholt worden. Es konnte ja vermutet werden, dass eine weitergehende Reinigung bezw. Befreiung der Saccharase von anhaftenden hochmolekularen Substanzen gerade die Diffussionsgeschwindigkeit des Enzyms stark beeinflussen würde. Die bis jetzt ermittelten Werte der Molekülgrösse liegen bei 20000. Diese Zahl dürfte das Ergebnis einer weitgehenden Polymerisation der eigentlichen Saccharasemoleküle sein, denen ein viel kleineres Mindestmolekulargewicht (1000—2000) zukommt.

Wirkungs-Bedingungen.

Aziditätsbedingungen. Im I. Teil dieses Buches sind die über die Aziditätsbedingungen der Saccharase ermittelten Tatsachen eingehend besprochen worden, da die Untersuchungen der Saccharase in dieser Hinsicht für das Studium anderer Enzyme vorbildlich gewesen sind.

Es sei hier also zunächst nochmals auf die Kurven von Sörensen und von Michaelis verwiesen (Teil I, Fig. 5 und 6, S. 31 und 32), aus welchen hervorgeht, dass die „optimale Zone" im Aziditätsgebiet pH = 3,5—5,5 liegt.

Es erscheint bemerkenswert, dass nach Versuchen von Myrbäck[2]) mit viel weitergehend gereinigten Präparaten (bis zum Zeitwert 0,6) die gleiche Aziditätskurve erhalten wird, wie z. B. aus folgenden Zahlen hervorgeht, welche sich auf die Lösung K 3 A der zitierten Arbeit beziehen.

---

[1]) Euler und Gösta Ericson Koll. Zs 30; 1922.

[2]) Euler und Myrbäck, H 120, 61; 1922. — Sv. Vet. Akad. Arkiv. f. Kemi Bd. 8, 1922.

Puffer	pH	k · 10⁴	Rel. k
$KH_2PO_4 + H_2SO_4$	3,29	37	92,5
KH_2PO_4	4,37	39,5	99
KH_2PO_4	4,55	40,0	100
$KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$	5,05	38,5	97
$KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$	6,51	23,3	58

Diese Unabhängigkeit der Lage des Aziditätsoptimums vom Reinheitsgrad des Enzyms macht es auch wahrscheinlich, dass die diesbezüglichen Verschiedenheiten der Lösungen von Darm- und Hefensaccharase nicht auf den geringeren Reinheitsgrad der ersteren zurückgeführt werden können.

Die Deutung, welche die genannten experimentellen Ergebnisse durch Michaelis erfahren haben, ist ebenfalls im I. Teil dieses Buches, S. 111 bis 123, ausführlich dargestellt worden. Einstweilen hat Michaelis die seinen theoretischen Erörterungen zugrunde liegende Hypothese modifiziert.

Michaelis[1]) hatte die Aktivitätskurve als Dissoziationsrestkurve der Saccharase aufgefasst und den Parameter dieser Kurve als Dissoziationskonstante der Saccharase, $2 \cdot 10^{-7}$, angegeben. Die Annahme steht aber mit einer Reihe von Tatsachen in Widerspruch und Michaelis führt nun als neue, verbesserte Hypothese ein[2]), dass der Parameter der Aktivitätskurve (Geschwindigkeits-pH-Kurve) die Säuredissoziationskonstante der Verbindung Rohrzucker-Saccharase ist. Ob die freie Saccharase auch selbst eine Säure ist, wird bei dieser neuen Auffassung zunächst offen gelassen.

Auch wenn die besonderen Annahmen von Michaelis noch weiterer, eventuell wesentlicher Änderungen bedürfen[3]), so sind doch seine eingehenden Erörterungen über die Anwendungen des Massenwirkungsgesetzes auf die enzymatische Kinetik der Saccharase sehr bemerkenswert und haben zweifellos einen Fortschritt gegenüber den früheren theoretischen Arbeiten in diesem Gebiet gebracht, da die von ihm entwickelten Formeln einer experimentellen Prüfung unterworfen werden können und die Konstanten schon zum Teil zahlenmässig festgestellt sind. Dadurch dürfte sich auch das eingehende Referat im I. Teil rechtfertigen.

Nach Ansicht des Verfassers[4]) bleibt in erster Linie noch zu untersuchen, ob nicht die Berücksichtigung der Salzbildung des Substrats die Beschreibung der Tatsachen und Berechnung der charakteristischen Aktivitäts-pH-Kurve vervollständigt.

Einfluss von Neutralsalzen. Gegen die neutralen Halogenide und Sulfate der Alkalien, alkalischen Erden und seltenen Erden (z. B. Thoriumsulfat) ist Saccharase wenig empfindlich. Dies wird auch durch moderne Versuche von Fales und Nelson[5]) gezeigt, nach welchen sich die Wirkung von NaCl erst in 2-norm. Lösung geltend macht, wenn der pH-Wert optimal ist. Es dürfte sich hier um eine der nichtenzymatischen „Neutralsalzwirkung"

[1]) Michaelis und Menten, Biochem. Zs 49, 333; 1913.

[2]) Michaelis und Rothstein, Biochem. Zs 110, 217; 1920.

[3]) Euler und Svanberg, H. 98, 202; 1917. — (Auf die neueren Arbeiten von Northrop kommen wir bei der Behandlung des Pepsins zurück.)

[4]) Euler und Myrbäck, H. 120; 1922.

[5]) Fales und Nelson, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 2769; 1915.

verwandte Erscheinung handeln[1]). Stärker wird diese Salzwirkung ausserhalb des Aziditätsoptimums. Eine weitere Untersuchung der freien Basen $Ca(OH)_2$, $Ba(OH)_2$, $Mg(OH)_2$ und der seltenen Erdbasen bei pH = 6 wäre erwünscht.

Unter älteren Untersuchungen ist noch diejenige von Cole[2]) zu erwähnen; aus neueren Messungen glaubte Neuschlosz[3]) schliessen zu können, dass die Neutralsalze vom Enzym adsorbiert werden und dadurch die Ladung und den Dispersitätsgrad herstellen.

Anorganische Nichtelektrolyte. Wasserstoffsuperoxyd zerstört nur unbedeutend; in höherem Grade inaktiviert Ozon; ein Sauerstoffstrom, enthaltend 0,2 mg O_3, in 5 ccm Enzymlösung eingeleitet, liess aus einer Lösung vom Zeitwert c:a5 in wenigen Minuten 31% der Aktivität verschwinden[4]).

Auch Jod inaktiviert nach Versuchen von S. Landergren[5]) in einer ziemlich weitgehend gereinigten Lösung stark und zwar irreversibel.

Das Jod wurde in verdünnter JK-Lösung zugesetzt. Inkubationszeit 1 Stunde. Zeitwert der Saccharaselösung: 0,86 Min. If = 54.

Zugesetzt mg J_2	0	0,07	0,15	0,74
$k \cdot 10^4$	36	17,7	17,9	16,8

Aus diesen Zahlen und noch deutlicher aus der Figur 24 ersieht man, dass das untersuchte Enzympräparat auffallenderweise nur bis zu einem gewissen Grad vergiftet wird[6]); über diesen hinaus wirken auch ziemlich grosse Jodmengen nicht mehr.

Durch Zusatz von Natriumthiosulfat im Überschuss wird die Jodvergiftung der Saccharaselösungen nicht aufgehoben.

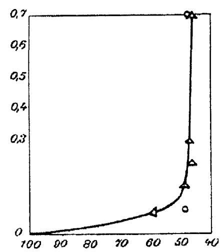


Fig. 24.

Schwermetallsalze. Die Wirkung von Quecksilber-, Silber- und Kupfersalzen ist von Euler und Svanberg[7]) eingehend studiert worden; im I. Teil ist über diese Messungen schon berichtet. Von den Resultaten, welche an Enzymlösungen vom Zeitwert etwa 5 Minuten gewonnen worden sind, seien hier folgende nochmals erwähnt:

1. Die sehr starke Giftwirkung, welche Quecksilber- und Silbersalze auf Saccharase ausüben, ist quantitativ reversibel.

2. $HgCl_2$ wirkte nicht proportional seiner Konzentration (Mitteilung I, Fig. 1).

3. Das Substrat übt auf die Vergiftung durch Schwermetallsalze eine Schutzwirkung aus (Mitteilung I, S. 342).

---

[1]) Siehe hierzu Michaelis, Biochem. Zs 115, 269; 1922.

[2]) Cole, Jl of Physiol. 30, 281; 1904.

[3]) Neuschlosz, Pflüg. Arch. 181, 45; 1920.

[4]) Svanberg, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 8, Nr. 6; 1921.

[5]) Euler und Landergren Biochem. Zs 131; 1922.

[6]) Die für obiges Saccharasepräparat gefundene Jodempfindlichkeit stimmt der Grössenordnung nach mit der von U. Olsson für seine Amylasepräparate festgestellten überein.

[7]) Euler und Svanberg, Fermentforschung 1920. I. Mitt. 3, 330. Siehe daselbst ältere Angaben. — III. Mitt. 4, 90. — IV. Mitt. 4, 142.

4. Bei der Metallvergiftung der Saccharase tritt mit der Zeit eine „Selbstregeneration“ des Enzyms ein, welche Analogien zum sog. Danysz-Effekt zeigt.

5. Cu^{++} übt auf Saccharase eine sehr viel schwächere Giftwirkung aus als Hg^{++} und Ag^{+}, während es bekanntlich nach Naegeli ein ausserordentlich starkes Protoplasmagift ist.

Das Hauptziel dieser Untersuchung war, durch Feststellung der Konzentrationsfunktionen der verschiedenen Gifte Anhaltspunkte über die Art und Menge der vergiftbaren Enzymgruppen in Saccharaselösungen von bekannter Wirksamkeit zu gewinnen.

Bei der Metallvergiftung der Saccharase werden Hg^{++} und Ag^{+} durch Komplexbildung entionisiert. Dieser Vorgang wurde bei $AgNO_3$ quantitativ elektrometrisch verfolgt (Mitteilung I, S. 367 und Mitteilung IV, S. 149) und es wurden zahlreiche Substanzen vergleichend elektrometrisch untersucht, um festzustellen, welche von ihnen ein annähernd gleiches Bindungsvermögen für Ag^{+} besitzen. Ein starkes Bindungsvermögen wurde gefunden beim Eier-Albumin von Sörensen, bei Zystein und bei einer Nukleinsäure.

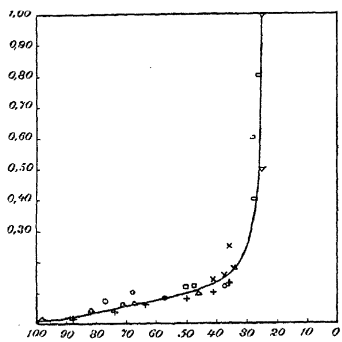


Fig. 25.

Bei einer Ausdehnung dieser Messungen auf andere Enzymkonzentrationen, auch auf bedeutend reinere Saccharaselösungen, ergaben die Messungen von Myrbäck[1]) das auffallende Resultat, dass bei pH = 4,5 mit $AgNO_3$ eine Vergiftungsgrenze erreicht wird.

Als Beispiel sei folgender Versuch angeführt, geltend für optim. pH:

Saccharaselösung K3A, If = 84 (Zeitwert 0,55 Min.). In 60 ccm 8 prozentiger Rohrzuckerlösung gibt 1 ccm die Inversionskonstante $49 \cdot 10^{-4}$. In der Figur 25 sind als Ordinaten die zu diesen Lösungen zugesetzten mg $AgNO_3$ angegeben. Die Kurve zeigt, dass auch bei Silberzusätzen, welche über 1 mg steigen, noch 25 % der Saccharasewirkung erhalten bleibt. Auch die Vergiftung durch $AgNO_3$ ist stark von der Azidität der Lösung abhängig.

Bei der Vergiftung mit Quecksilbersalzen machen sich störende Einflüsse mannigfacher Art geltend; auch hier bleibt unter Umständen ein Teil der Enzymwirkung durch Giftüberschuss unverändert.

Organische Hemmungskörper. Bei der Untersuchung des Verf. mit Svanberg[2]) haben sich unter den organischen Saccharasegiften Anilin und p-Toluidin als die wirksamsten erwiesen; auch diese Vergiftungen sind

[1]) Euler und Myrbäck, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 8, 1922.
[2]) Euler und Svanberg, Fermentforsch. 4, 29; 1920.

(zum Teil) reversibel. Die Konzentrationsfunktion der Anilinvergiftung wurde eingehend festgestellt; man findet die Resultate im I. Teil, S. 152. Mit der Wirksamkeit des Anilins wurden die Wirksamkeiten von 11 anderen Aminen verglichen.

Es wurde festgestellt, dass die Reihenfolge der Giftigkeit der Reihenfolge der Affinität zu Formaldehyd bei der Bildung der Schiffschen Basen entspricht, was besonders bei Anthranilsäure hervortritt.

Später hat Myrbäck ähnliche Messungen an reinerer Saccharase (Zeitwert 0,55) angestellt. Als besonders wirksames Gift erwies sich p-Phenylendiamin; die Vergiftungskurve führt, wie die Figur 26 zeigt, bis zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms.

Ohne Wirkung erwies sich Benzylalkohol, welcher von Landergren in Rücksicht auf die Ergebnisse von Macht[1]) und von Jacobson[2]) untersucht wurde.

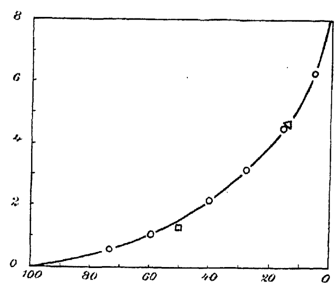


Fig. 26.

Was andere Aldehydreagenzien betrifft, so ist Blausäure wenig schädlich; 8 mg HCN erzeugt in 60 ccm Enzym-Rohrzuckerlösung nur eine Wirksamkeitserniedrigung von 10%. Quantitativ untersucht sind ferner: Hydroxylamin, Hydrazin und Phenylhydrazin. Hervorzuheben ist, dass die Messungen Svanbergs, welche im I. Teil, S. 151 u. ff. referiert sind, für optimale Azidität (pH = 4,5) gelten.

Unter den wirksamen Aminreagenzien ist Formaldehyd zu nennen, welcher zur Vergiftung der Saccharase einer mehrstündigen Inkubationszeit bedarf, sowie Diazoniumsalz.

Was die Alkaloide betrifft, so ist Chininsulfat bei der optimalen Azidität der Saccharase sehr wenig wirksam (Euler und Svanberg)[3]), dagegen wird, wie Rona und Bloch[4]) gezeigt haben, die prozentische Hemmung sehr stark, im alkalischen Gebiet (pH = 7—8). Man kann dies so ausdrücken, dass nur die freie Alkaloidbase inaktiviert, nicht aber das Salz. Aus den Versuchen von Rona und Bloch geht auch hervor, dass die Vergiftung augenblicklich erfolgt und reversibel ist.

Eine langsam verlaufende, vermutlich irreversible Zerstörung des Enzyms tritt mit m- und p-Nitrophenol ein, wie eine interessante Studie von Rona und Bach[5]) ergeben hat.

---

[1]) **Macht**, Jl of Pharm. 11, 263; 1918.
[2]) **Jacobson**, Soc. Biol. 83, 255 u. 1054; 1920.
[3]) **Euler** und **Svanberg**, Fermentforsch. 4, 29; 1920.
[4]) **Rona** und **Bloch**, Biochem. Zs 118, 185; 1921.
[5]) **Rona** und **Bach**, Biochem. Zs 118, 232; 1921.

Verhalten zu organischen Lösungsmitteln.

Wir haben hier zwei Tatsachengebiete zu unterscheiden. Einerseits wird die Enzymwirkung durch den Zusatz von organischen, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln verlangsamt, zweitens wird Saccharase in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln mit einer gewissen Geschwindigkeit zerstört.

a) Inversionsgeschwindigkeit in wässerig-alkoholischen Lösungen. Steigert man in Saccharaselösungen unter sonst konstant gehaltenen Konzentrationsbedingungen den Gehalt an Äthylalkohol, so nimmt die enzymatische Inversionsgeschwindigkeit, wie schon O'Sullivan und Tompson[1]) für kleine Alkoholmengen gefunden haben, mit steigendem Alkoholzusatz stark ab. Aus Fig. 27, welche einer Arbeit von Hudson und Paine[2]) entnommen ist, wird der Einfluss über ein grösseres Konzentrationsgebiet ersichtlich.

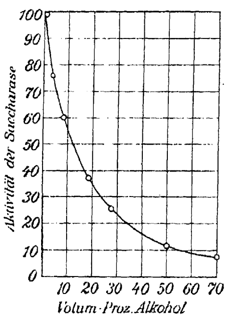


Fig. 27.

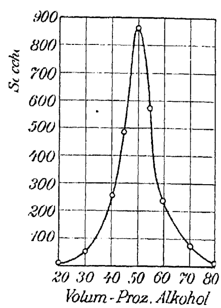


Fig. 28.

gebiet ersichtlich. An diesem Gesamteffekt sind drei Einzelwirkungen des Alkohols beteiligt: 1. eine reversible Änderung der Reaktionsfähigkeit (des Molekularzustandes der Saccharase), 2. eine analoge Änderung des Rohrzuckers, 3. eine irreversible Zerstörung der Saccharase.

Wegen der zweiten der genannten Wirkungen wird auch die nichtenzymatische Inversion durch Zusatz von Alkohol verlangsamt, und was andere Lösungsmittel betrifft, so gilt im grossen und ganzen die Regel, dass die Reaktionsgeschwindigkeit in Lösungsmitteln von hoher Dielektrizitätskonstante am grössten ist.

Auch andere Alkohole, sowie Azeton setzen die enzymatische Inversionsgeschwindigkeit stark herab. So ist z. B. in 70prozentigem Glyzerin die Inversionsgeschwindigkeit sehr gering.

Irreversible Inaktivierung der Saccharase durch Alkohol und Azeton. Die erste eingehende Untersuchung hierüber haben Hudson

[1]) O'Sullivan und Tompson, Jl Chem. Soc. 57, 834 und zwar 860; 1890.

[2]) Hudson und Paine, Jl Amer. Chem. Soc 32, 1350; 1910.

und Paine[1]) ausgeführt, deren Messungen ein sehr scharfes Maximum der Zerstörung der Saccharase bei 50 Volumprozent Alkohol ergeben haben (s. Fig. 28).

Die Figur zeigt, dass Alkohol unter 20% und über 80% nicht mehr zerstörend wirkt. Der Umstand, dass hochprozentiger Alkohol wenig schadet, hängt wohl mit seiner fällenden Wirkung zusammen. Rohrzucker übt nach den amerikanischen Forschern eine sehr bedeutende Schutzwirkung aus.

Willstätter und Racke fanden, dass Azeton die Saccharase in ähnlicher Weise hemmt und zerstört wie Äthylalkohol (l. c. S. 104). Sie fanden ferner die Zerstörung in hohem Masse vom Reinheitsgrad der Saccharase abhängig.

Kinetik.

Kein anderes Enzym ist hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs seiner Wirkung und hinsichtlich der Konzentrationsfunktionen so eingehend untersucht worden wie die Saccharase. Da ausserdem bei diesem Enzym die Verhältnisse in mancher Hinsicht ziemlich einfach liegen — das Substrat ist leicht rein darstellbar, der chemische Vorgang ist einfach, Co-Enzyme scheinen nicht mitzuwirken —, so ist die Rohrzuckerinversion durch Saccharase im allgemeinen Teil dieses Buches (S. 105—123) als Beispiel für enzymatische Reaktionen überhaupt ausführlich behandelt worden.

Auch was die theoretische Deutung des vorliegenden Zahlenmaterials betrifft, kann auf das im 1. Teil Gesagte verwiesen werden.

Bezüglich der von Michaelis gegebenen Deutung der pH-Aktivitätskurve muss auch an dieser Stelle auf die von ihm eingeführte Modifikation[2]) seiner früheren Vorstellung verwiesen werden, nach welcher sich die genannte Kurve auf die Verbindung Saccharase-Rohrzucker bezieht.

Ergänzend mag erwähnt werden, dass natürlich noch andere Deutungen der Aziditätskurve als die von Michaelis gegebene möglich sind. Geht man von der gut begründeten Annahme aus, dass die Reaktionsgeschwindigkeit proportional ist der Konzentration Enzym-Substrat, so wird man bei wechselnder Azidität ein Aktivitäts-Maximum bei derjenigen Azidität zu erwarten haben, bei welcher die Konzentration der Molekülart Saccharase-Rohrzucker ihr Maximum erreicht. Eine solche Aziditätsfunktion würde sich auch dann herleiten lassen, wenn man von der Säurenatur der Saccharase ganz absieht. Wir brauchen nur anzunehmen, dass die eine der beiden Komponenten eine innere Umlagerung erfährt und dass die Form, welche sich mit der anderen Komponente vereinigt, ihre maximale Konzentration bei der Azidität pH = 4—5 besitzt[3]).

Über den Einfluss der Zuckerkonzentration siehe Brown (Jl Chem. Soc. 1902) und Myrbäck (1922).

Eine Reversion, also eine enzymatische Synthese des Rohrzuckers, dürfte bis jetzt noch nicht einwandfrei durchgeführt worden sein. Immerhin verdienen die von Pantanelli[4]) angegebenen Versuche eine Wiederholung und Erweiterung. Siehe hierzu I. Teil, S. 225.

[1]) Hudson und Paine, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 1350; 1910.
[2]) Michaelis und Rothstein, Biochem. Zs 110, 217; 1920.
[3]) Euler und Myrbäck, H. 120; 1922.
[4]) Pantanelli, Bot. Ber. 26a, 494; 1908.

Einfluss der Temperatur.

Stabilität der Saccharase.

Den eingehenden Erörterungen des ersten Teiles, S. 174 können wir zunächst folgende Tatsachen entnehmen:

Die Stabilität des Enzyms wird ausgedrückt durch einen Reaktionskoeffizienten erster Ordnung, k_c. Da dieser Koeffizient um so grösser ist, je schneller die Inaktivierung verläuft, so wird er als Inaktivierungskoeffizient bezeichnet. Er ist nicht unabhängig von der Verdünnung des Enzyms und von der Erhitzungszeit; deswegen sind zur Bestimmung des Inaktivierungkoeffizienten bzw. der Inaktivierungskonstanten[1]) folgende Bedingungen vorgeschlagen worden:

Erhitzungszeit 50—70 Minuten, Interpolation auf 60 Minuten. Die Enzymkonzentration ist so zu wählen, dass bei Zimmertemperatur die Inversionskonstante unter Normalbedingungen den Wert $40 \cdot 10^{-4}$ erreicht.

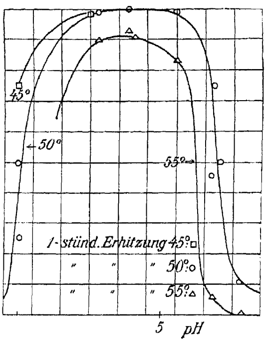


Fig. 29.

Die Stabilität der Saccharase ist in erster Linie von der Azidität und von der Temperatur und schliesslich von der Gegenwart von Schutzstoffen und Adsorbentien abhängig.

Betrachten wir zunächst Schutzstoff-freie Lösungen, so gelten für den Einfluss der Azidität die von Laurin[2]) gegebenen Kurven (Fig. 29). Sie zeigen ein ausgeprägtes Optimum im Aziditätsgebiet pH = 4—5.

Beträchtliche Schutzwirkungen üben der Rohrzucker bzw. dessen Spaltprodukte aus: Hinsichtlich der Fruktose lagen schon einige ältere Versuche von Hudson und Paine[3]) vor. Mit neuerer Methodik hat Laurin die Wirkung eines Zusatzes von 4% Rohrzucker bei 60° untersucht und gefunden, dass schon durch diesen verhältnismässig geringen Zusatz eine Schutzwirkung von etwa 40% der gesamten Inaktivierung erreicht wird. Vermutlich ist die Schutzwirkung des Rohrzuckers bzw. der Spaltprodukte auf der sauren Seite geringer als auf der alkalischen. Verhältnismässig unbedeutend ist die Schutzwirkung von Eiweissstoffen.

Die Inaktivierungsgeschwindigkeit, also auch der Wert von k_c, wächst sehr stark mit der Temperatur (vergl. I. Teil, S. 185) wie folgende Zahlen zeigen, welche für die Stabilität der Oberhefensaccharase in reiner wässeriger (nur Puffer enthaltenden) Lösung und für optimale Azidität gelten:

Temperatur	58	60	62	64
$k_c \cdot 10^3$	3	8	20	45

[1]) Ihr inverser Wert, $1/k_c$ wird Stabilitätskonstante genannt.

[2]) Euler und Laurin, H. 108, 64; 1919 und 110, 55; 1920.

[3]) Hudson und Paine, Jl. Amer. Chem. Soc. 32, 985 und zwar 988; 1910.

Berechnet man die Temperaturkonstante A aus den experimentell ermittelten Inaktivierungskoeffizienten k_c nach der Formel

$$k_{c_2} = k_{c_1} \cdot e^{\frac{A(T_2 - T_1)}{2 T_2 T_1}},$$

so ergibt sich A zu 101000. Diese Temperaturkonstante A ändert sich, wie Figur und Tabelle auf Seite 185 des I. Teiles ausweisen, nicht unerheblich mit der Azidität.

Vergleichen wir die Inaktivierungskonstante der Saccharase für eine gewisse Temperatur, etwa für 60°, mit derjenigen anderer Enzyme, so finden wir, dass die Saccharase bezüglich ihrer Temperaturempfindlichkeit eine Mittelstellung einnimmt.

Malz-Amylase	38	Saccharase	5—8
β-Glukosidase	13	Pepsin (c : a)	3,6
		Trypsin	0,6

Viel empfindlicher sind Lab und Katalase, viel stabiler sind Urease und Papain.

Dabei ist allerdings zu betonen, dass noch keines dieser Enzyme in reinem Zustande untersucht worden ist, und dass möglicherweise die reinen Enzyme sich labiler oder stabiler erweisen werden. Von einem gewissen Grad der Verunreinigung an ist der Einfluss auf die Grösse von k_c nicht mehr erheblich, wie Verfasser mit Laurin an Saccharase festgestellt hat. Die zu diesen Messungen verwendeten Enzymlösungen hatten aber im Mittel die Aktivität If = 7,5. Ganz neuerdings haben Verfasser und Myrbäck[1]) diese Messungen mit einer wesentlich reineren Lösung wiederholt, deren Inversionsfähigkeit If = 39—84 betrug (Zeitwert = 1,2 – 0,55), und in welcher die Saccharase vom Hefengummi weitgehend befreit war. Die folgende Figur 30 zeigt das Ergebnis der neuen Versuchsreihe neben den früheren Laurin'schen Werten.

Die Temperaturempfindlichkeit erwies sich nicht immer grösser als die des weniger gereinigten Enzyms, vielmehr war die Temperaturempfindlichkeit des Präparates vom Zeitwert 0,55 wesentlich geringer, entsprechend einem Temperaturunterschied von etwa 2°. Ähnliche Differenzen hat Laurin zwischen Saccharase aus Oberhefe und aus Unterhefe gefunden. Andererseits ist die Möglichkeit zu erwägen, dass letzterer Unterschied auf Ungleichheiten hinsichtlich gebundener Stoffe zurückzuführen ist, welche nicht eigentlich zum Saccharasemolekül gehören. Schliesslich muss auch betont werden, dass das Gesagte bezüglich der Temperaturempfindlichkeit bei optimaler Azidität gilt, während die Empfindlichkeit auf der sauren oder alkalischen Seite weit grössere Divergenzen aufweisen könnte.

[1]) Euler und Myrbäck, H. 119; 1922.

Einfluss der Temperatur auf die Inversionsgeschwindigkeit.

Bereits im ersten Teil ist in der Tabelle S. 193 gezeigt worden, dass der Temperaturkoeffizient der Saccharasewirkung demjenigen der meisten anderen Enzymreaktionen entspricht, indem sich zwischen 20° und 30° die Geschwindigkeit bei einer Temperatursteigerung von 10° verdoppelt; $k_{30} : k_{20} = 2$. Der Temperaturkoeffizient A der Arrhenius'schen Temperatur-

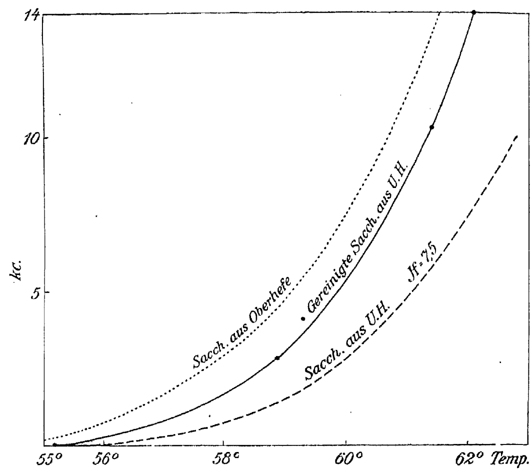


Fig. 30.

formel nimmt mit steigender Temperatur nicht unerheblich ab. Nach neueren Messungen von Laurin[1]) lässt sich A durch eine Interpolationsformel

$$A = 11400\ (1 - 0{,}009\ t)$$

zwischen 0° und 50° gut darstellen. Mit dieser Formel stehen auch die früher von Kjeldahl und von O'Sullivan und Tompson gewonnenen Resultate gut im Einklang.

Bemerkenswert ist, dass der Temperaturkoeffizient der nicht enzymatischen Säurekatalyse des Rohrzuckers erheblich grösser ist als derjenige der enzymatischen Inversion. Für die Temperatur von 20° ist nämlich bei der Reaktion

Rohrzucker-Salzsäure	Rohrzucker-Saccharase
A = 25600	9400.

Die Temperaturabhängigkeit der Saccharase setzt sich aus verschiedenen Temperatureinflüssen zusammen, welche in der Arbeit von Euler und Laurin (1920) näher besprochen sind. Aus den dortselbst mitgeteilten

---

[1]) Euler und Laurin, H. 110, 55; 1920.

Messungen scheint hervorzugehen, dass die Gleichgewichtskonstante zwischen Saccharase und Rohrzucker, welche ja die Konzentration der reagierenden Molekülart bestimmt und damit auf die Reaktionsgeschwindigkeit einen wesentlichen Einfluss besitzt, sich mit der Temperatur nicht wesentlich ändert. Natürlich ist zu berücksichtigen, dass die Reaktionsfähigkeit des Rohrzuckers selbst mit der Temperatur wächst, und auch die elektrolytischen Dissoziationsgleichgewichte von Enzym und Substrat von der Temperatur beeinflusst werden können.

Einfluss der Strahlung.

(Vergleiche I. Teil S. 197 ff.)

Wie Downes und Blunt, Fernbach[1]), Emmerling[2]) sowie Jamada und Jodlbauer[3]) fanden, wird Saccharase von den Strahlen des Sonnenlichts in sauerstofffreier Atmosphäre nur wenig geschädigt, erst die Gegenwart von Sauerstoff bedingt eine erheblichere Lichtdestruktion.

Durch Zusatz gewisser Gruppen von fluoreszierenden Stoffen kann die Lichtempfindlichkeit der Saccharase erhöht werden, und zwar sind auf Saccharase als Sensibilisatoren Stoffe aus der Fluorescein-, Anthrazen-, Thiazin- und Chinolingruppe wirksam[4]).

Ultraviolette Strahlen wirken nach Jodlbauer und v. Tappeiner[5]) dagegen unabhängig von der Gegenwart von Sauerstoff. Agulhon[6]) sucht die Lichtzerstörung durch die Bildung von Wasserstoffsuperoxyd und dessen Einwirkung auf die Saccharase zu erklären. Zur Aufklärung dieser Frage wurde eine gereinigte Lösung von Saccharase, If = 8,6, aus dem hiesigen Laboratorium verwendet. Svanberg[7]), der diese Versuche in Quarzgefässen mit einer Quecksilberlampe ausgeführt hat, fand Lösungen von geringerem Trockensubstanzgehalt erheblich empfindlicher als weniger reine Lösungen. Die Lichtwirkung konnte durch Einleiten von Wasserstoff verhindert werden, was darauf hindeutet, dass es sich hier grösstenteils um einen sekundären photochemischen Effekt handelt. Die Vermutung Agulhons, dass die Lichtdestruktion auf die Bildung von Wasserstoffsuperoxyd zurückzuführen ist, trifft indessen nicht zu; Saccharase ist gegen dieses Oxydationsmittel sehr unempfindlich. Viel grösser ist ihre Empfindlichkeit gegen Ozon, aber auch diese Wirkung ist für die quantitative Erklärung des Lichteffektes nicht ausreichend.

[1]) Fernbach, Ann. Pasteur, 3, 483; 1889.
[2]) Emmerling, Chem. Ber. 34, 3811; 1901.
[3]) Jamada und Jodlbauer, Biochem. Zs 8, 62; 1908.
[4]) Jodlbauer und v. Tappeiner, Arch. f. klin. Med. 82, 520; 1905.
[5]) Jodlbauer und v. Tappeiner, Arch. f. klin. Med. 87, 373; 1906.
[6]) Agulhon, Ann. Pasteur, 26, 38; 1912.
[7]) Svanberg, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. 8, Nr. 6; 1921.

Anreicherung lebender Zellen an Saccharase.

Saccharase der Hefen.

Die ersten Versuche wurden von Wortmann 1882 und von Fernbach 1890 angestellt; die Untersuchung des letzteren Forschers muss, wie schon früher betont wurde, als eine für die damalige Zeit bedeutende Leistung bezeichnet werden, wenn auch die angewandten Methoden und die Berechnung der Messungen nicht mehr dem jetzigen Stand der Enzymforschung entsprechen. Von teilweise anderen Gesichtspunkten aus und mit modernen Hilfsmitteln hat Verf. mit einer Reihe von Mitarbeitern den Einfluss der Nährlösung und die Bedingungen der Temperatur und der Azidität studiert, unter welchen eine Hefe ihr Maximum an Saccharasegehalt erreicht[1]). Im ersten Teil dieses Buches (S. 284 ff.) ist schon ziemlich ausführlich darüber berichtet worden, so dass hier nur mehr unter Hinweis auf die Originalarbeiten die wesentlichsten Punkte erwähnt zu werden brauchen.

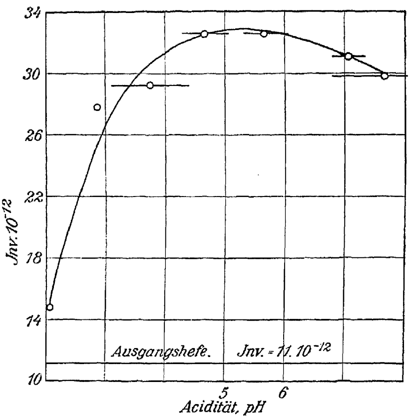


Fig. 31.

Die Vermehrung der Saccharase findet im allgemeinen in Lösungen statt, welche neben geeigneter Stickstoffnahrung (besonders Aminosäuren, Peptiden und Peptonen) einen gärfähigen Zucker enthalten. Letzterer kann durch andere Kohlenstoffnahrung nicht ersetzt werden. Der Verlauf der Enzymbildung ist dann ziemlich regelmässig, eine Verdoppelung tritt im allgemeinen in 12—20 Stunden ein, und die Anreicherung kann mehrmals wiederholt werden, so dass der Enzymgehalt schliesslich bis auf den 7 fachen ursprünglichen Betrag der Hefe gesteigert werden konnte.

Was den Temperatureinfluss[2]) betrifft, so ist ein gewisser Zusammenhang zwischen Enzymbildung und Zellenzuwachs wahrscheinlich geworden. Bei der daraufhin untersuchten Unterhefe H lag das Optimum der Saccharasebildung bei 27,5°, das Optimum des Zellenzuwachses bei 23,5°.

Die gleiche Unterhefe zeigte (Fig. 31) ein ausgesprochenes Aziditäts-Maximum der Saccharasebildung[2]) bei pH = 5—6. Dabei ist zu bemerken, dass sich die Hefe einerseits bis zu einem gewissen Grade der Azidität der Lösung

[1]) Euler u. af Ugglas, Sv Vet. Akad. Ark. f. Kemi, Bd. 3, Nr. 34; 1910. — Euler u. Johansson, H. 76 u. 84. — Euler u. Meyer, H. 79. — Euler u. Cramér, H. 88 u. 89. — Euler, Biochem. Zs. 85, 406; 1918. — Euler u. Svanberg, H. 106, 201; 1919.

[2]) Euler u. Svanberg, H. 106, 201; 1919.

anpasst (Euler u. Emberg 1918), andererseits selbst eine gewisse, allerdings über ihrem Aziditätsoptimum liegende Azidität in der Nährlösung einstellt.

Auch der Rückgang der Anpassung an die Temperatur ist durch einige orientierende Versuche untersucht worden.

Saccharasebildung in abgetöteter Hefe.

Bei der beschleunigten Autolyse fanden Willstätter und Racke öfters in den Auszügen mehr Saccharasewirkung als in den angewandten Hefen. Unter 27 Hefeproben wurde in 14 Fällen Zuwachs an Inversionsvermögen gefunden. „Die Zunahme an Invertinwirkung ist entweder durch die Beseitigung oder Abschwächung eines Hemmungskörpers oder durch die postmortale Bildung des Enzyms aus einer inaktiven Vorstufe, einem Zymogen, zu erklären. Die Annahme, dass beim Abtrennen der Autolysenflüssigkeit mit den Hefenrückständen ein Hemmungskörper beseitigt wird, verliert an Wahrscheinlichkeit durch Versuche, in denen ohne Abtrennung eines Extraktes Zunahme an invertierender Wirkung festgestellt wurde."

Beim Zerreiben der frischen Hefe pflegte eine derartige Vermehrung der enzymatischen Wirksamkeit nicht einzutreten, denn die Bestimmungen mit zerriebener Hefe waren gute Bestätigungen der Saccharasebestimmung in frischer Hefe. Als aber einmal eine besonders Saccharase-arme Hefe mit der 2—3fachen Menge Seesand kräftig zerrieben und mit Wasser eine halbe Stunde geschüttelt wurde, lieferte sie $119 \pm 4\,\%$ der ursprünglichen Saccharase. Willstätter und Racke ziehen also den Schluss, dass die Hefezelle zwar oft nur fertige Saccharase enthält, zuweilen aber neben der fertigen in untergeordnetem Masse auch eine Vorstufe derselben.

Übrige Saccharasen.

Unter den Mucorarten ist nach E. Chr. Hansen[1]) nur Mucor racemosus imstande, Rohrzucker zu invertieren. Neuerdings haben nun S. Kostytschew und Eliasberg[2]) die interessante Beobachtung beschrieben, dass nur „Mucor racemosus —" Saccharase enthält, während „Mucor racemosus +" gar keine Inversion des Rohrzuckers bewirkt. Wie die Autoren betonen, ist es beachtenswert, dass zwei Pilzrassen, „die morphologisch absolut nicht zu unterscheiden sind, ganz prägnante physiologische Unterschiede zeigen."

Saccharase der Aspergillaceen.

Schon lange weiss man, dass sich die Saccharase in Aspergillaceen findet[3]), besonders durch Arbeiten von Bourquelot[4]), Fernbach[5]), Duc-

---

1) E. Chr. Hansen, Medd. Carlsb. Lab. 2, 143; 1888.
2) S. Kostytschew und Eliasberg, H. 118, 233; 1922.
3) Zuerst beobachtet von Béchamp, C. r. 46, 44; 1858.
4) Bourquelot, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 16, 578.
5) Fernbach, Ann. Inst. Pasteur, 4, 1; 1890.

laux, Went, Effront. Quantitative Versuche haben später ergeben[1]), dass die Inversionsfähigkeit per g Zellensubstanz bei den untersuchten Schimmelpilzen bedeutend kleiner ist, als bei den Kulturhefen. Es wurden nämlich folgende relativen Werte für If gefunden:

Unterhefe	100	Penicillium glaucum	10
Oberhefe	60	Aspergillus niger	2.

Hinsichtlich der Aziditäts- und Temperatur-Einflüsse scheint die Saccharase der Schimmelpilze sich von der Hefensaccharase wenig zu unterscheiden.

Kosmann[2]) hat Saccharase auch in anderen niederen Pilzen nachgewiesen. In Fusarien findet sich Saccharase nach Wasserzug[3]) und ist in verschiedenen Fusariumarten von Hawkins[4]) näher studiert worden.

Bakterien-Saccharase.

Wegen des Nachweises in verschiedenen Bakterienarten sei auf die Zusammenstellungen von Fuhrmann[5]) und von Kruse[6]), besonders auch auf die Arbeiten von Fermi und Montesano[7]) verwiesen. Bemerkenswert ist der Befund von Avery und Glenn E. Cullen[8]), dass das Aziditäts-Optimum der Pneumokokken bei etwa pH = 7 liegt. Es ist zu vermuten, dass dies für die Saccharasen vieler anderer Bakterien gilt, welche sich ebenfalls bei dieser Azidität oder in ganz schwach alkalischer Lösung am besten entwickeln.

B. Delbrück enthält Saccharase (Cramér), Milchsäure-Streptococcus Sbg. nicht (Fermentf. 2, 194).

Saccharase der Leukozyten.

In einer interessanten Arbeit hat es kürzlich Boissevain[9]) wahrscheinlich gemacht, dass in den Leukozyten des normalen tierischen Blutes Saccharase enthalten ist. Rohrzucker scheint eine Schutzwirkung auf diese Saccharase auszuüben. Die Tatsache, dass nach Injektion von Rohrzucker ins Blut die invertierende Wirkung desselben steigt, deutet Boissevain damit, dass die aus den Leukozyten austretende Saccharase durch den Rohrzucker gebunden und dadurch vor schneller Zerstörung bewahrt wird.

Als Aziditätsoptimum für die Leukozyten-Saccharase gilt pH = 7,9.

1) Euler und Asarnoj, Fermentforsch. 3, 318; 1919. Euler und Borgenstam, Fermentforsch. 4, 242; 1921.

2) Kosmann, Bull. Soc. Chem. 27, 251; 1877.

3) Wasserzug, Ann. Inst. Pasteur, 1, 525; 1886.

4) Hawkins, Jl Agr. Research 6, 1916. Ref. Zbl. f. Biochemie 21, 404; 1920.

5) Fuhrmann, Bakterienenzyme. Fischer, Jena 1907.

6) Kruse, Allgemeine Mikrobiologie, Leipzig 1910.

7) Fermi und Montesano, Zbl. Bakt. (2) 1, 482, 542; 1895. Fermi, Zbl. Bakt. 12, 713.

8) Avery und Glenn Cullen, Jl of exp. med. 32, 583; 1920.

9) Boissevain, Ned. Tijdschr. Geneesk. 1, 226; 1918 u. Arch. Néerl. Physiol. II, 3, 415.

Saccharase als „Abwehrferment“ nach Abderhalden.

Ein typischer Versuch, auf welchen Abderhalden seine Behauptung stützt[1], dass nach intravenöser Injektion von Rohrzucker bei höheren Tieren Saccharase als Abwehrferment gebildet wird, ist im I. Teil, S. 272 angegeben worden. Es würde zu weit führen, hier auf die sehr interessante aber noch ungeklärte Frage einzugehen, ob, resp. wann Rohrzucker als Abwehrferment auftritt[2]. Wird nach Einführung von Rohrzucker ins Blut der Saccharasegehalt der Leukozyten oder Organzellen vermehrt, so ist diese Enzymbildung vielleicht wesensgleich mit der in Hefezellen genauer studierten.

C. Methoden zur Messung der Spaltung der Hexoside. Definitionen und Einheiten der Enzymwirkungen.

In erster Linie kommt hier die polarimetrische Methode in Betracht. Besonders zur Verfolgung der Inversion des Rohrzuckers ist sie wegen der grossen Drehungsänderung sehr genau und auch bisher zu dem vorliegenden Zweck fast ausschliesslich angewandt worden.

Wenn die Beobachtung der Drehung wegen Trübheit der Lösung schwer oder unmöglich ist, so kann man den Fortschritt der Reaktion durch das Reduktionsvermögen der Lösung — etwa nach der Methode von Bertrand — messen. Aus dem nicht reduzierenden Rohrzucker entstehen zwei reduzierende Hexosen, auch bei der Maltosespaltung steigt das Reduktionsvermögen der Lösungen. Immerhin wird man letztere Methodik nur in Ausnahmefällen verwenden.

Rohrzuckerinversion.

Wesentlich ist, dass man, wie schon O'Sullivan und Tompson getan haben, die Inversion bei geeigneter Azidität, am besten bei optimaler Azidität verlaufen lässt. Man sorgt dafür durch Zusatz eines Puffers zur Lösung, wozu gewöhnlich Phosphat verwendet wird, obwohl natürlich auch andere Puffer brauchbar sind (vgl. Teil I, S. 43). Die optimale Azidität liegt für Hefensaccharasen im pH-Gebiet 3,5 bis 5, während die tierischen Saccharasen in neutraler Lösung, um pH = 6, am besten zu wirken scheinen.

Bezüglich der Wahl der Temperatur ist man, wenn die Azidität optimal ist, bis zu etwa 45° hinauf nicht beschränkt, bei noch höheren Wärmegraden ist Vorsicht geboten, von 55° an lässt sich eine Zerstörung des Hefen-Enzyms nicht vermeiden. In der Regel wird man die Inversion zwischen 15 und 25° verlaufen lassen.

[1] Die ersten Angaben über das Auftreten einer Saccharase nach subkutaner Injektion im Blut junger Hunde verdankt man Weinland (Zs f. Biol. 47, 279; 1906).

[2] Siehe hierzu auch Herzfeld u. Klinger, Biochem. Zs 114, 27; 1921. — Abderhalden, ebenda 117, 161; 1921. — Knaffl-Lenz, H. 120, 110; 1922.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist von der Konzentration des Rohrzuckers abhängig und diese muss also in Rechnung gezogen werden, sofern man nicht zur Prüfung der Wirksamkeit einer Lösung gewissen Vorschriften folgt, was zu empfehlen ist.

Bei der enzymatischen Inversion des Rohrzuckers entsteht primär α-Glukose, welche sich aber in Lösung bald mit β-Glukose ins Gleichgewicht setzt. Durch die Nichtbeachtung dieses Umstandes, der schon O'Sullivan und Tompson bekannt war, und auf den später Hudson[1]) wieder nachdrücklich aufmerksam gemacht hat, haben mehrere kinetische Untersuchungen ihren Wert verloren. Die Umlagerung der α-Glukose verläuft übrigens schon bei geringem Überschuss von Hydroxylionen, also etwa in 0,001 n. NaOH-Lösung bei Zimmertemperatur in wenigen Minuten vollständig. Man hebt die „Mutarotation" der Glukose am besten mit Sodalösung auf.

Für die Berechnung der Inversionskonstanten k kann man die Enddrehung entweder experimentell bestimmen oder aus der Anfangsdrehung berechnen. Die maximale Linksdrehung (Enddrehung), L max., ergibt sich nach der Formel:

$$\text{L max.} = \text{R max.}\ (0{,}44 - 0{,}005\ t).$$

Zur Messung und Angabe der Wirksamkeit kann man in zweierlei Weise verfahren.

1. Man bestimmt die Zeit, welche unter gewissen Wirkungsbedingungen vergeht, bis die Drehung der enzymhaltigen Rohrzuckerlösung auf 0° gesunken ist. Diese Art der Wirkungsbestimmung, welche den Vorzug grosser Einfachheit besitzt, stammt von O'Sullivan und Tompson (l. c.), ist später im Stockholmer Laboratorium oft verwendet worden und bildet die Methode, nach welcher Willstätter seine Präparate misst.

0,05 g getrocknete Hefe (oder der dieser Menge entsprechende Auszug) oder 0,05 g Enzympräparat werden in 5 ccm 0,5 n. NaH_2PO_4-Lösung aufgeschlemmt bzw. gelöst und dann zu 20 ccm 20 prozentiger Rohrzuckerlösung gegeben. Man misst die Zeit, welche verfliesst, bis bei gegebener Temperatur (15°—20°, Temperaturkoeffizient siehe S. 194) nach Aufhebung der Mutarotation durch Soda die Drehung bei gelbem Licht 0° beträgt.

Man schreibt:

$$\pm 0^0 = t\ \text{Minuten},$$

und bezeichnet die so ermittelte Anzahl Minuten als Zeitwert.

Dieser Zeitwert ist offenbar ein Mass für die Saccharasemenge in der Lösung bzw. für den Reinheitsgrad des eingewogenen Präparates.

Man kann natürlich auch, statt feste Saccharasepräparate einzuwägen, aus dem Trockengewicht von Saccharaselösungen den Zeitwert bestimmen.

[1]) Hudson, Jl Amer. Chem. Soc. 30, 1160; 1564; 1908.

Die Drehung 0° entspricht für die D-Linie einer Spaltung von 75,75% der Totalreaktion. Willstätter und Racke (l. c. S. 8) bringen die pufferhaltige Zuckerlösung mit etwa so viel Saccharaselösung auf 100 ccm, dass die Hydrolyse zur Nulldrehung 60—180 Minuten erfordert. Zwischen 50 und 75% Spaltung wird die Reaktion durch Eintragen von 25 ccm in 5 ccm 2-n. Soda gehemmt.

Für die Extrakte bezieht Willstätter die Zeitwerte auf die verarbeiteten Hefen (Saccharase aus 0,05 g wasserfreier Hefe), so dass sie ein Mass der Ausbeute darstellen (Zeitwert bezogen auf Hefe);

$$\frac{\text{Zeitwert der Hefe}}{\text{Zeitwert d. Extr. b. a. H.}} \cdot 100 = \text{Ausbeute.}$$

Um auch die Enzymmengen (und bei den Präparaten die Ausbeute) zu bestimmen und zu vergleichen führt Willstätter zwei Ausdrücke ein:

Menge-Zeit-Produkt und Menge-Zeit-Quotient.

Ersteres ist die Zeit, die zur Inversion des Rohrzuckers bis auf 75,75% erforderlich wäre, wenn die gesamte Enzymmenge unter den angegebenen Bedingungen auf 4 g Rohrzucker in 25 ccm einwirken würde.

Der Menge-Zeit-Quotient (M.Z.Q.) ist der reziproke Wert, ist Enzymmenge in einer konstanten willkürlich gewählten Gewichtseinheit ausgedrückt, nämlich der Quotient des in Form von Hefe, Extrakt oder Präparat gewogenen (bzw. abgemessenen) Materials und seiner durch den Minutenwert gemessenen Wirkungszeit. Dieser Wert, der Enzymmenge direkt proportional, ist additiv; den Summen verschiedener Saccharasemengen entsprechen die Summen ihrer Menge-Zeit-Quotienten.

2. Verf. zieht es zu genaueren Bestimmungen vor, die katalytische Wirkung eines Präparates oder einer Lösung durch die Inversionskonstante[1]) auszudrücken, welche in einer Rohrzuckerlösung von bekannter Zusammensetzung erreicht wird. Die Inversionskonstante k wird berechnet nach der Gleichung

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{R + L}{\alpha + L}$$

wo R die Anfangsdrehung, L die Enddrehung und α die Drehung zur Zeit t bezeichnet.

In der Regel wird mit dekadischen Logarithmen gerechnet und die Zeit in Minuten ausgedrückt.

Die Inversionskonstante k, dividiert durch die Konzentration des Enzympräparates (%) ergibt die Aktivitätszahl k/%.

Zeitwert t und Reaktionskonstante k sind (bei gleicher Temperatur) durch die Gleichung verbunden:

$$k \cdot t = 0{,}6153.$$

---

[1]) Trotz des leichten Ansteigens der Konstanten bei optimaler Azidität stellen die Mittelwerte dieser Konstanten ein hinreichend genaues Mass der Aktivität dar, und bieten etwas grössere Sicherheit, als wenn nur eine einzige Zeitmessung ausgeführt würde.

Inversionsfähigkeit.

Euler und Svanberg[1]) haben für die Inversionsfähigkeit eines Präparates oder Saftes die Beziehungen aufgestellt:

$$\mathrm{If} = \frac{\mathrm{k} \cdot \mathrm{g\,Zucker}}{\mathrm{g\,Trockensubstanz}} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\mathrm{k} \cdot \mathrm{g\,Zucker}}{\mathrm{g\,Präparat}}.$$

Aus der Aktivitätszahl k/% wird If erhalten durch Multiplikation mit

$$\frac{0{,}08}{\text{Trockensubstanz-Prozent der Enzymlösung}}.$$

Aus dem O'Sullivan-Tompsonschen Zeitwert $\pm$ 0° = t Minuten (berechnet für 4 g Rohrzucker und 0,05 g Präparat), ergibt sich If für 18° durch die Gleichung[2])

$$\mathrm{If} = \frac{46{,}176}{}$$

Bestimmung der Saccharase in den Hefezellen.

Es ist zur Charakterisierung der verschiedenen Hefen wesentlich, den Enzymgehalt, hier den Saccharasegehalt der Zellen quantitativ bestimmen zu können. In dieser Hinsicht sind folgende Tatsachen hervorzuheben:

Suspendiert man frische Hefezellen in Rohrzuckerlösungen, so tritt während der Inversion die Saccharase nicht in die Rohrzuckerlösung über, wie durch Abzentrifugieren der Hefe während der Reaktion gezeigt werden kann[3]). Arbeitet man mit den gewöhnlichen Kulturhefen, und zwar mit Unter- oder Oberhefe, so kommt beim Aufschlemmen geeigneter Hefemengen in Rohrzuckerlösungen der gesamte Saccharasegehalt der Hefe zur Wirkung, und zwar unabhängig davon, ob die Zellen durch Trocknen (bei Zimmertemperatur) entwässert oder durch Toluol bzw. Chloroform an Zuwachs oder Gärtätigkeit gehemmt werden oder frisch zur Anwendung kommen. Dieses Resultat ist auch durch Willstätter und Racke eingehend bestätigt worden, welche nachwiesen, dass Zerreiben der Zellen usw. die enzymatische Tätigkeit der Hefenmasse nicht erhöht. Nur schien aus einer Reihe von Beobachtungen an abgetöteter Hefe hervorzugehen, dass die Hefezelle „neben der fertigen Saccharase in untergeordnetem Masse eine Vorstufe derselben enthält“ (l. c. S. 37), vgl. S. 197.

Die Bestimmung des Saccharasegehalts der Hefe führt man, um die Resultate unmittelbar vergleichen zu können, am besten unter ein für allemal festgelegten Bedingungen aus.

---

[1]) Euler und Svanberg, H. 106, 201; 1919.

[2]) Denn bei 18° ist L max = R max. (0,44—t · 0,005) = 0,36 R max und log (1,36/0,36) = 0,5772 · .· Inversionskonst. $= \mathrm{k} = \frac{0{,}5772}{\mathrm{t}}$.· $\mathrm{If} = \frac{\mathrm{k} \cdot \mathrm{g\,Zucker}}{\mathrm{g\,Substanz}} = \frac{0{,}5772 \cdot 4}{\mathrm{t} \cdot 0{,}05} = \frac{46{,}176}{\mathrm{t}}$.

[3]) O'Sullivan, Jl Chem. Soc. 61, 593; 1892/3. — Euler und Kullberg, H. 71, 29; 1910.

In den meisten neueren Bestimmungen aus dem Stockholmer Laboratorium wurde 0,5 g frische Hefe (etwa 30% Trockengewicht) in 60 ccm 8 prozentiger Rohrzuckerlösung, welche rund 1% Phosphat enthielt, aufgeschlemmt.

Wir gehen dazu über, 1 g frische Hefe, deren Trockengewicht bestimmt wird, in 100 ccm 8-prozentiger Rohrzuckerlösung aufzuschlemmen, welche durch Zusatz von 1% Phosphatpuffer auf pH = 4,5 gebracht ist.

Nur bei schwacher Saccharasewirkung ist Zusatz von Toluol notwendig.

Die Hemmung der von Zeit zu Zeit dem Reaktionsgemisch zu entnehmenden Proben geschieht durch Sodalösung, von welcher die Hefe baldmöglichst abfiltriert wird, oder durch Sublimatlösung.

Willstätter und Racke (l. c. S. 12) empfehlen Anwendung von 16-prozentiger Rohrzuckerlösung und suspendieren 2,00 g frische Hefe in 100 ccm.

Willstätter drückt die Wirksamkeit der Hefe wie die von Präparaten durch den Zeitwert aus.

Euler und Svanberg[1]) führen das Inversionsvermögen, Inv. ein und berechnen es durch den Ausdruck:

$$\text{Inv.} = \frac{k \cdot g\,\text{Zucker}}{\text{Zellenzahl}}.$$

Für die Umrechnung in die Inversionsfähigkeit If (vgl. S. 202) muss man die Zellenzahl der Hefe pro Gewichtseinheit kennen. Für frische Hefe ist, wie für Präparate

$$\text{If} = \frac{k \cdot g\,\text{Zucker}}{g\,\text{Hefe}}.$$

Nicht für alle Hefen ist es ohne weiteres angängig, den Saccharasegehalt in obiger Weise zu bestimmen. Es machen sich hier die gleichen Schwierigkeiten geltend, wie bei der Bestimmung der Maltase und Laktase, und es muss in dieser Hinsicht auf die Originalarbeiten verwiesen werden[2]).

Anhang: Anti-Saccharase.

Über die Existenz einer spezifischen Antisaccharase[3]) können bis jetzt noch keinerlei endgültige Angaben gemacht werden. Schuetze und Bergell haben sich nach ihren 1907 an Kaninchen ausgeführten Versuchen allerdings sehr entschieden ausgesprochen:

„Es ist ... durch unsere Tierversuche bewiesen, dass durch eine monatelang fortgesetzte Behandlung von Kaninchen mit subkutanen Injektionen von Invertin sich ein Serum gewinnen lässt, welches Invertin in nachweisbarer Weise beeinflusst."

[1]) Euler und Svanberg, H. 106, 201; 1919. — Siehe auch Euler und Cramér, H. 88, 430; 1913.

[2]) Willstätter, Oppenheimer und Steibelt, H. 110, 232; 1920; H. 111, 157; 1920. — Willstätter und Oppenheimer, H. 118, 168; 1921. — Euler und Josephson, H. 120, 42; 1922.

[3]) Siehe hiezu Teil I, S. 275.

Indessen ist zunächst hervorzuheben, dass die Spezifität der von den genannten Forschern beobachteten Hemmung nicht nachgewiesen ist. Auch was überhaupt den Eintritt einer Hemmung oder genauer, die Vergrösserung der normalen Saccharasehemmung durch Serum nach Enzyminjektion betrifft, ein Effekt, der eventuell unspezifisch sein könnte, so sind weitere Versuche wünschenswert[1]; denn selbst wenn man von der schnellen Bildung von Antikörpern nach Enzyminjektion im Blut überzeugt ist, bleibt zu bedenken, dass die bis jetzt injizierten Saccharasepräparate aus Hefe stammten[2], deren Rohrzucker-spaltendes Enzym mit der Blutsaccharase vermutlich nicht identisch ist (vergl. S. 164).

Neue Versuche, welche E. v. Knaffl-Lenz im hiesigen Laboratorium begonnen hat (H. 120, 110; 1922), konnten auch keinen Beweis für die Existenz einer Antisaccharase liefern.

Raffinase (Frukto-Raffinase).

Die Annahme eines besonderen Raffinose spaltenden Enzyms stützt sich besonders auf die neuen Untersuchungen von Willstätter und Kuhn[3].

Substrat. Raffinose; Nadeln oder Prismen vom Schmpt. 80°.

$[\alpha]_D = 104^0 - 105{,}7^0$. Reduziert nicht Fehlingsche Lösung. Wird enzymatisch in zweierlei Weise gespalten:

1. in Fruktose und Melibiose durch die Raffinase,

2. in Galaktose und Rohrzucker durch eine Komponente des Emulsins (Neuberg)[4], woraus die Anordnung der 3 Hexosen im Molekül hervorgeht:

$$\text{Fruktose} - \underbrace{\overbrace{\text{Glukose} - \text{Galaktose}}^{\text{Melibiose}}}_{\text{Rohrzucker (Fruktose — Glukose)}}$$

Melibiose
Fruktose — Glukose — Galaktose
Rohrzucker

Vorkommen in Hefen.

Das Raffinose spaltende Enzym findet sich in vielen Hefen, aber nicht in allen, auch nicht in allen denen, welche Rohrzucker spalten. Nach Lindner vergären Monilia candida Hansen und Hefe Nr. 602 des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe (gewonnen aus Danziger Jopenbier) Rohrzucker, greifen aber Raffinose nicht an. Schizosaccharomyces octosporus Beijerinck und Hefe Nr. 370 sollen umgekehrt Raffinose, nicht aber Rohrzucker vergären.

[1] Über Hemmungen der Saccharasewirkung durch Serum siehe auch Anselm Eriksson (H. 72), dessen Ergebnisse allerdings auch durch Nichtkonstanz der Aziditätsbedingungen beeinflusst sein können.

[2] Nach Schuetze und Braun (Zs. Klin. Med. 64, 509, 1907) wirkt Antimalzamylase nicht auf tierische Amylasen.

[3] Willstätter und Kuhn, H. 115, 180; 1921.

[4] Neuberg, Biochem. Zs 3, 519; 1907.

Dass die Quotienten der Raffinase- und Saccharasezeitwerte in verschiedenen obergärigen Hefen keineswegs gleich sind, ersieht man aus folgendem Auszug aus einer von Willstätter und Kuhn gegebenen Tabelle:

Hefe	Vergleichszeitwerte		Quotient
	Rohrzucker	Raffinose	
Brennereih. Kopenhagen . .	0,52	2,65	5,1
Spiritush. Stadlau	12,1	65	5,4
Brennereih. Rasse XII . . .	1,26	15,6	12,3
Brennereih. M	2,62	18,3	7
Branntweinh. Sinner . . .	3,36	24,9	7,4

Der Quotient der Zeitwerte variiert hier im Verhältnis 1 : 2,5. Man kann hieraus mit Willstätter den Schluss ziehen, „dass die Spaltung der beiden Zuckerarten (Rohrzucker und Raffinose) nicht auf ein und dasselbe Enzym zurückgeführt werden kann". Immerhin ist es auffallend, mit wie grosser Annäherung die enzymatischen Spaltungen der beiden Zuckerarten in den verschiedensten Hefen parallel laufen, und der Eindruck dieser weitgehenden Parallelität wird noch verstärkt durch folgenden Auszug aus Willstätters und Kuhns Tabelle, welche die Quotienten der Raffinase- und Saccharase-Zeitwerte von Saccharasepräparaten angibt[1]), die verschiedenen Reinigungsverfahren unterworfen worden sind.

Präparat	Quotient
Nur durch $Al(OH)_3$ gerein. Zeitw. 4,8. Frei v. Melibiase . .	11,2
Dass. Präp., weiter d. Kaolinads. gerein. Zeitw. 0,86	11,2
Ebenso gerein., dann mit Uranacetat behandelt. Zeitw. 1,96 .	11,4
Präp. aus frakt. enzym. Hefeabbau, d. Ads. gerein. Zeitw. 1,4	9,3

Der Umstand, dass der Quotient nicht den Wert 1 besitzt, sagt natürlich an sich nichts über die Existenz oder Nichtexistenz einer besonderen Raffinase aus, denn ein und derselbe Katalysator wird in der Regel zwei verschiedene Substrate mit verschiedener Geschwindigkeit spalten, z. B. eine organische Säure zwei verschiedene Ester[2]). Die Verschiedenheit der Quotienten deutet auf die Existenz zweier verschiedener Katalysatoren, aber die geringe Variation lässt vermuten, dass die beiden Katalysatoren so grosse physikalische und chemische Ähnlichkeiten besitzen wie etwa die Angehörigen homologer Reihen und es wäre weiter denkbar, dass diese beiden homologen Katalysatoren die

[1]) H. E. Armstrong u. Glover (Proc. Roy. Soc. B. 80, 312; 1908) hatten mit einer nicht näher definierten Saccharaselösung den Quotienten (für 50% Hydrolyse) zu 5,4 gefunden.

[2]) E. F. Armstrong u. Caldwell (Proc. Roy. Soc. B. 73, 526; 1904 u. 74, 195; 1905) fanden für die relative Geschwindigkeit der Hydrolyse durch katalysierende, stark dissoziierte Säuren die folgenden Werte:

Laktose	1	Rohrzucker	1240
Maltose	1,27	Raffinose	1040.
α-Methylglukosid	0,17		

beiden Substrate angreifen, aber mit verschiedenen absoluten und relativen Geschwindigkeiten. Die beiden eingangs erwähnten Befunde von Lindner an Monilia candida und an Schizosaccharomyces octosporus betreffen nur die Vergärung und würden, auch wenn sie sich bestätigen, überhaupt keinen Einwand bilden, falls man mit Willstätter besondere Zymasen für die Vergärung der einzelnen zusammengesetzten Zuckerarten annimmt.

Die Auffassung, dass die Hydrolyse von Raffinose und Rohrzucker von demselben Enzym bewirkt wird, wurde früher von E. Fischer[1]), A. Bau[2]), H. E. Armstrong, l. c., E. F. Armstrong[3]), Hérissey[4]) und C. S. Hudson[5]) vertreten.

Nach Bourquelot[6]) und Gillot[7]) kommt Raffinase in Schimmelpilzen vor. Eine neuere und umfassendere Untersuchung der Raffinosespaltung durch Schimmelpilze verdankt man Pringsheim und Zemplén[8]). Collin[9]) hat die Hydrolyse der Pilzsaccharide durch Botrytis cinerea studiert.

Invertebraten: Mollusken und Crustaceen. In zahlreichen wirbellosen Tieren haben Bierry und Giaja ein Enzym nachweisen können, welches Raffinose spaltet; so Bierry und Giaja[10]) im Magen-Darmsaft von Helix, Giaja[11]) zum Teil gemeinschaftlich mit Gompel in Mollusken, Crustaceen und Insekten.

Bierry bezeichnet das Enzym, welches u. a. Trisacchariden auch Raffinose aufspaltet, als Lävulopolyase. Bierry sowie Bourquelot und Bridel betonen, dass im allgemeinen die Fruktose zuerst aus der Raffinose freigemacht wird, so dass Melibiose zurückbleibt, welche dann weiter zerlegt wird.

In höheren Tieren ist eine enzymatische Spaltung der Raffinose mehrmals vergeblich gesucht worden (E. Fischer und Niebel, l. c.); keinesfalls ist eine solche Spaltung mit Sicherheit nachgewiesen[12]). Dieser Umstand macht es auch schwer, die Aufteilung der Raffinose in Fruktose und Melibiose der Saccharase zuzuschreiben.

[1]) Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. d. Preuss. Akad. 5, 73; 1896. — E. Fischer, H. 26, 60; 1898. — Siehe auch Pantz und Vogel (Zs f. Biol. 32, 304; 1895), nach welchen Raffinose durch den Dünndarm des Hundes und Pferdes nicht gespalten wird.

[2]) Bau, Wochenschr. f. Brau. 17, 698; 1900.

[3]) E. F. Armstrong, The simple Carbohydrates. 3. Aufl. London 1919.

[4]) Hérissey und Lefèvre, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 26, 56; 1907.

[5]) C. S. Hudson, Jl Amer. Chem. Soc. 36, 1566; 1914. — C. S. Hudson u. Harding, ebenda 37, 2193; 1915.

[6]) Bourquelot, Soc. Biol. 48, 205; 1896.

[7]) Gillot, Bull. Acad. R. sc. Belg. 1899, 211 und 1900, 99.

[8]) H. Pringsheim und Zemplén, H. 62, 367; 1909.

[9]) Collin, Thèses, Paris 1911.

[10]) Bierry und Giaja, Soc. Biol. 61, 485; 1906. — Bierry, Biochem. Zs 44, 426; 1912.

[11]) Giaja und Gompel, Soc. Biol. 62, 1197 und 63, 508; 1907. — Giaja, Thèses, Paris 1909.

[12]) Möglicherweise findet eine Hydrolyse der Raffinose im Darm durch Vermittlung von Bakterien statt (Kuriyama und Mendel, Jl of Biol. Chem. 31, 124; 1917).

Über die zweite Art der Raffinosespaltung durch Emulsin siehe Neuberg, Biochem. Zs 3, 519; 1907.

Wirkungsbedingungen der enzymatischen Raffinosespaltung.

Es handelt sich hier fast durchweg um das von Willstätter und Kuhn studierte Hefenenzym.

Azidität. Aus der von Willstätter und Kuhn ermittelten Kurve (Fig. 32), geht hervor, dass das Aziditätsoptimum der Raffinosespaltung recht nahe mit demjenigen der Rohrzuckerspaltung (vgl. S. 185) zusammenfällt; es liegt bei etwa pH = 5. Dagegen scheint die erstgenannte Reaktion gegen höhere Aziditäten (pH = 2) weniger empfindlich zu sein. Die Kurve gilt für die Temperatur von 30°.

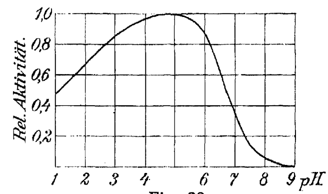


Fig. 32.

Kinetik.

„Auch in den anderen Voraussetzungen der Bestimmung gleichen sich Raffinase und Saccharase. Proportionalität von Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge trifft für die Spaltung der Raffinose in demselben Bereich von 1:40 zu, wie für die Rohrzuckerinversion“.

Enzymmenge ccm in 25	Minuten	Drehungsabnahme	Spaltung %	Minuten	Drehungsabnahme	Spaltung %
0,25	400	1,62°	24,8	600	2,28°	34,9
0,5	200	1,67	25,6	300	2,33	35,7
1,0	100	1,67	25,6	150	2,37	36,3
2,5	40	1,71	26,2	60	2,41	36,9
5,0	20	1,71	26,2	30	2,41	36,9
10,0	10	1,70	26,0	15	2,38	36,5

Der zeitliche Verlauf der Spaltung erinnert ebenfalls an die für die Saccharase bekannt gewordenen Verhältnisse. Die Gültigkeit der Reaktionsgleichung erster Ordnung ist zuerst von H. E. Armstrong und Glover behauptet worden. Dies wird innerhalb der Grenzen von 30—60% Spaltung von Willstätter und Kuhn bestätigt. Diese Forscher haben also mit Hilfe der theoretischen Kurve ihre gefundenen Werte auf 50%ige Hydrolyse interpoliert.

Minuten	Drehung	Spaltung %	$k \cdot 10^4$	Minuten	Drehung	Spaltung %	$k \cdot 10^4$
0	13,71°	0,0	—	60	11,14°	39,4	36,2
10	13,26°	6,9	31,0	80	10,55°	48,4	35,9
20	12,76°	14,5	34,0	110	9,80°	60,0	36,2
30	12,30°	21,6	35,2	160	9,00°	72,1	34,6
45	11,67°	31,3	36,2	220	8,35°	82,1	34,0
				∞	7,18°	100	—

Methoden zur Bestimmung der Raffinase.

Die Spaltung der Raffinose in Melibiose und Fruktose wird polarimetrisch verfolgt. Willstätter und Kuhn (l. c.) ermitteln als Zeitwert „die Anzahl Minuten, welche 0,5 g Trockengewicht von Hefe oder Enzympräparat brauchen würden, um bei 30° und optimalem pH in 25 ccm 2,061 g $C_{18}H_{32}O_{16} \cdot 5\,H_2O$ zu 50% zu spalten. Die vollständige Hydrolyse liefert 2,5%ige Fruktoselösung. Das Aziditätsoptimum (pH = 4,5) wurde durch Zusatz von 1 ccm 20%iger NaH_2PO_4-Lösung eingestellt".

Gentianase (Frukto-Gentianase).

Substrat: Gentianose, $C_{18}H_{32}O_{16}$, kommt in den Wurzeln der Gentianaarten vor. Schmelzp. 209—211°. $[\alpha]_D = +31,2° - 33,4°$. Säuren spalten in 1 Mol. Fruktose und 2 Mol. Glukose. Die Anordnung der Hexosen geht aus folgendem Schema hervor:

$$\overbrace{\text{Fruktose} - \text{Glukose}}^{\text{Rohrzucker}} - \text{Glukose}$$
$$\text{Fruktose} - \underbrace{\text{Glukose} - \text{Glukose}}_{\text{Gentiobiose}}$$

Vorkommen: Ein Hefenenzym bewirkt die Spaltung in Fruktose und Gentiobiose, während durch Emulsin und besonders durch Extrakte aus Aspergillus niger die Aufteilung in Rohrzucker und Glukose ermöglicht wird (Bourquelot)[1]).

Durch Enzymgemische aus Invertebraten, besonders Schnecken, erfolgt nach Bierry[2]) zuerst die Abtrennung von Fruktose, dann die Spaltung der Gentiobiose.

Die Eigenschaften der Gentianase und ihre Beziehung zur Raffinase und Saccharase sind noch nicht ausreichend untersucht. Die Annahme eines besonderen Enzymes ist also vorläufig noch hypothetisch.

Frukto-Stachyase.

Substrat: Stachyose, zuweilen auch Mannotetrose benannt, $C_{24}H_{42}O_{21} + 4\,H_2O$, wird nach Schulze und Planta[3]), sowie Winterstein[4]) aus Stachys tubifera und aus dem Wurzelsystem von Lamium album und Labiaten, sowie aus weissem Jasmin gewonnen. Identität mit Lupeose noch unbestimmt.

---

[1]) Bourquelot, C. r. 126, 1045; 1898. — 133, 690; 1902. — Jl de Pharm. et Chim (6) 16, 578; 1902. — Bourquelot und Hérissey, C. r. 132, 571; 1901. — 135, 290 u. 399; 1902. — 136, 762; 1903. — Bourquelot und Bridel, Jl de Pharm. et Chim. (7) 3, 569; 1911. — C. r. 152, 1060; 1910.

[2]) Bierry, C. r. 148, 949; 1909. — Biochem. Zs 44, 426; 1912.

[3]) Schulze und v. Planta, Chem. Ber. 23, 1692; 1890. — 24, 2705; 1891. — 43, 2230; 1910.

[4]) Winterstein, Landw. Versuchsst. 41, 375.

Verlust des Krystallwassers bei 115—120°. Schmelzp. des Anhydrids 167° bis 170° (Tanret)[1]. Für die Hydratform ist $[\alpha]_D = 133{,}9°$ (Neuberg)[2].

Lupeose (Schulze, Chem. Ber. 43) aus Lupinensamen ist nach Tanret (C. r. 155) vermutlich mit Stachyose identisch.

Enzymatische Spaltung. Die Anordnung der vier Hexosereste im Molekül und die Wirkung der Enzyme geht aus folgendem Schema hervor:

$$\text{Fruktose} - \underbrace{\text{Glukose} - \text{Galaktose} - \text{Galaktose}}_{\text{Mannotrisaccharid}}$$

(Hefenenzym und Kefirlaktase).

Das Mannotrisaccharid hat Neuberg als Osazon isoliert.

Das spaltende Hefenenzym wurde von Neuberg (l. c.) nach der von E. Fischer für Maltase angegebenen Vorschrift dargestellt und deswegen entsprechend bezeichnet. Über die Identität dieses Enzyms mit anderen hydrolysierenden Enzymen dieser Gruppe, besonders mit Saccharase, liegen noch keine Anhaltspunkte vor[3].

Auch von Enzymen aus dem Magen-Darmkanal von Wirbellosen wird Stachyose nach Bierry[4] gespalten, und zwar nimmt dieser Forscher drei Stufen und drei Enzyme an.

Die andere mögliche Spaltung in Rohrzucker und Digalaktose durch Emulsin ist noch hypothetisch, wie besonders aus der Untersuchung von Neuberg hervorgeht.

Verbaskose aus Verbascum Thapsus ist ein vermutlich mit Stachyose isomerer Zucker (Bourquelot u. Bridel, C. r. 151). Über die enzymatische Spaltung ist nichts bekannt.

Melizitase

aus Aspergillus niger soll Melizitose (Melizitotriose) in 1 Mol. Glukose und 1 Mol. Turanose zerlegen (Bourquelot[5]).

Rhamnino-Rhamnase oder Rhamno-Rhamninase

aus Helix pomatia spaltet nach Bierry[6] Rhamninose (aus Xanthorhamnin) in 2 Mol. Rhamnose und 1 Mol. Galaktose.

[1] Tanret, C. r. 134, 1586; 1902. — 136, 1569; 1903. — Bull. Soc. Chim. 27 u. 29.

[2] Neuberg und Lachmann, Biochem. Zs 24, 171; 1910. — Siehe auch Neuberg, ebenda 3, 519; 1907.

[3] Siehe hierzu auch Vintilesco, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 30, 167; 1909.

[4] Bierry, Biochem. Zs 44, 446; 1912.

[5] Bourquelot u. Hérissey, Bull. Soc. Mycol. France 9; 1893.

[6] Bierry, Soc. Biol. 66, 738; 1909.

6. Kapitel.

β-Glukosidasen.

In diesem Kapitel werden Reaktionen behandelt, welche durch Komponenten des Emulsins beschleunigt werden. Bekanntlich ist das Emulsin kein einheitliches Enzym, sondern eine Mischung solcher Stoffe, welche β-Hexoside, besonders β-Glukoside sowie auch β-Bioside katalytisch spalten. Als Hauptgruppen der Substrate der Emulsinkomponenten kann man angeben:

Alkyl- und Arryl-β-Glukoside und Gluko-β-Glukoside.

A. Allgemeines über Emulsin.

1. Ausgangsmaterial zur Darstellung des Emulsins. Vorkommen.

Da das Emulsin nicht an einem bestimmten, sondern an verschiedenen Substraten geprüft worden ist, besteht gegenwärtig kaum eine genauere Definition für dieses Präparat als die, dass es in wässeriger Lösung natürliche Glukoside spalten soll; dabei wurden zur Prüfung unter natürlichen Glukosiden meist die in höheren Pflanzen vorkommenden Verbindungen der Glukose mit aromatischen Resten ausgewählt, also Stoffe vom Salizin-Typus, oder es wurde die Wirkung speziell an Amygdalin geprüft, was wohl zum Teil auf historischen Gründen beruht; die Wirkung des 1830 von Robiquet und Boutron[1]) entdeckten, von Liebig und Wöhler[2]) „Emulsin" benannten Stoffes haben letztere Forscher nämlich 1837 gerade am Amygdalin untersucht. Robiquet sprach bald darauf die Vermutung aus, dass der auf Amygdalin wirksame Stoff von derselben Art sei, wie die Diastase und nannte ihn Synaptase.

Als Ausgangsmaterial für die im Handel vorkommenden Emulsinpräparate werden meist süsse oder bittere Mandeln verwendet. Doch kommen glukosidspaltende Enzyme keineswegs nur in Mandeln vor, vielmehr sind sie sehr verbreitet in verschiedenen Organen zahlreicher Pflanzen, und zwar soll sich Emulsin auch in solchen Pflanzen finden, welche keine eigentlichen β-Glukoside enthalten; diese Angaben bedürfen allerdings noch einer Prüfung.

---

1) Robiquet et Boutron, Ann. de Chim. et Phys. (2) 44, 352; 1830. — Jl de Pharm. 23, 589; 1837. — Robiquet, ebenda 24, 196; 1838. — Lieb. Ann. 25, 175; 1838.

2) Liebig und Wöhler, Ann. Pharm. 22, 1; 1837. — Pogg. Ann. 41, 345.

Nächst den Mandeln sind als Ausgangsmaterial für die Darstellung zunächst die Samen anderer Prunaceen zu nennen, z. B. von Prunus domestica und Prunus persica.

Eingehende Untersuchungen über das Vorkommen von „Emulsin“ in Organen höherer Pflanzen verdankt man Bourquelot und besonders seinem Mitarbeiter Hérissey[1]), sowie Guignard[2]), Tanret, Bertrand, H. E. und E. F. Armstrong und Horton[3]) und Rosenthaler[4]). Aus allen Angaben geht hervor, dass die grössten Emulsin-Ausbeuten aus Rosaceen gewonnen werden, es kommen also ausser den Prunaceen auch noch die anderen Unterfamilien in Betracht, und zwar gewinnt man Emulsin nicht nur aus den Samen[5]), sondern auch aus den Stielen und Blättern, so z. B. beim Kirschlorbeer, Prunus laurocerasus, bei Prunus serotina u. a.

Über das Vorkommen im übrigen mag hier noch erwähnt werden:

Samen: Körner von Hülsenfrüchten nach Bertrand und Rivkind[6]). Samen von Ericineen und Ribesarten. Polygala[7]). Gekeimte Gerste[8]), Tabak[9]).

Wurzeln: Orchideen nach Guignard[10]). Enzian[11]). Verbascum Thapsus (Harlay 1905). Gräser.

Blätter: Aucuba japonica[12]), Sambucus-Arten[13]), Tabak[9]).

Rinde: Betula alba, Fraxinus excelsior (Bourquelot).

Milchgefäss-System des Embryo: Euphorbiaceen (Manihot-Arten) (Guignard).

In niederen Pflanzen hat ausser Bourquelot und Hérissey besonders Gérard[14]) das Vorkommen von Emulsin studiert. Kulturhefen spalten Amygdalin, Salicin, Arbutin (Henry und Auld, Proc. 76. — Neuberg und Färber, Biochem. Zs 78).

In vielen Flechten hat Hent[15]) Emulsin gefunden.

---

1) Hérissey, Recherches sur l'émulsine. Thèses, Paris 1899.

2) Guignard, C. r. 110, 477; 1890. — Jl de Bot. 4, 3; 1890. — Zum Teil hat Guignard den Nachweis des Emulsins auf Farbenreaktionen gegründet, welche mit den Wirkungen von Glukosidasen nichts zu tun haben. Die betreffenden Angaben erfordern eine Nachprüfung.

3) H. E. und E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 85, 363; 1912.

4) Rosenthaler, Arch. d. Pharm. 251, 56; 1913.

5) Bourquelot und Hérissey, C. r. 137, 56; 1903. — Äpfel- und Birnensamen sollen nur geringe Emulsinwirkung zeigen (Huber, Landw. Versuchsst. 75, 462; 1911).

6) Bertrand und Rivkind, C. r. 143, 970; 1906. — Bull. Soc. Chim. (4) 1, 497; 1906.

7) Bourquelot, Jl de Pharm. et de Chim. (5) 30, 433; 1894.

8) Maestrini, Atti Acad. d. Lincai 29 (5), 164; 1920.

9) Oosthuizen u. Shedd, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1289; 1913. — Traetta Mosca, Gazz. chim. ital. 43, II. 431; 1914.

10) Guignard, C. r. 141, 637; 1905.

11) Bourquelot und Hérissey, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 16, 513; 1902.

12) Bourquelot und Hérissey, Soc. Biol. 56, 655; 1904. — C. r. 138, 114; 1114; 1904.

13) Guignard, C. r. 141, 16; 1905.

14) Gérard, Soc. Biol. 45, 651; 1893. — Jl de Pharm. et de Chim. (5) 28, 11; 1893.

15) Hent, Arch. d. Pharm. 239, 581; 1900.

Ein ausführliches Referat der Angaben über das Vorkommen von „Emulsin“ kann hier um so eher unterbleiben, als diese Angaben sich meist nur auf eine Komponente des Emulsins beziehen.

Es ist eine Aufgabe der künftigen Forschung, die Verteilung der wichtigsten definierten Enzyme des Emulsins in den verschiedenen Pflanzen und Pflanzenorganen festzustellen.

Darstellung des Mandel-Emulsins.

Man hat bis jetzt meist nach der Vorschrift von Hérissey (Thèses, S. 44) oder von Bourquelot (Jl de Pharm. (6) 24; 1906. — Arch. de Pharm. 245, 172; 1907) gearbeitet:

100 g süsse Mandeln taucht man während etwa 1 Minute in kochendes Wasser, lässt abtropfen und entschält sorgfältig; man zerstösst sie in einem Marmormörser ohne Zugabe von Wasser möglichst fein. Man weicht das erhaltene Produkt in 200 ccm einer Mischung von gleichen Teilen reinen, destillierten und chloroformgesättigten Wassers bei Zimmertemperatur ein. Nach 24 Stunden koliert man durch ein angefeuchtetes Siebtuch. Man gewinnt auf diese Weise 150—160 ccm Lösung, welcher man tropfenweise Eisessig zugibt, um das Kasein[1]) zu fällen; hierauf filtriert man durch ein nasses Filter. Die trübe Flüssigkeit (120—130 ccm) wird nun mit 500 ccm 95%igem Alkohol versetzt; man sammelt den Niederschlag auf ein Faltenfilter, lässt abtropfen, gibt eine Mischung von Alkohol und Äther zu und trocknet dann im Vakuum über Schwefelsäure. Man erhält durchsichtige, hornartige Blätter, welche durch Zerreiben ein fast rein weisses Pulver liefern.

Im hiesigen Laboratorium hat E. Nordefeldt[2]) ebenfalls Emulsin aus Mandeln dargestellt; das Ausziehen des Mandelbreies geschah, wie es auch Willstätter und Csányi empfehlen, mit sehr schwach alkalischer Lösung; es hat sich als eine zweckmässige Verbesserung erwiesen, den Extrakt nicht mit Alkohol, sondern mit Azeton zu fällen.

Willstätter und Csányi[3]) geben folgende ausführliche Vorschrift:

„Die Mandeln werden zunächst in trockenes, ölfreies Pulver verwandelt. Um sie zu enthäuten, erwärmt man sie 1/4 Stunde mit Wasser von 60°—70°. Man trocknet sie oberflächlich an der Luft, zerkleinert sie in der Mandelmühle und entzieht ihnen in der hydraulischen Presse die Hauptmenge des Öles. Darauf werden sie mit dem Dreifachen an Äther in einer Flasche extrahiert, nach dem Absaugen in einer Walzenmühle gemahlen und nochmals mit der doppelten Menge Äther ausgezogen, abgesaugt und nachgewaschen. Das in einem warmen Luftstrom getrocknete Material wird in einer Siebmühle aufs feinste gemahlen. An Pulver, das für die Bestimmungen im Vakuumexsikator zu trocknen ist, erhält man etwa 1/3 vom Gewicht der Mandeln. Beim Aufbewahren nimmt es an enzymatischer Wirkung ab, z. B. in einem halben Jahre um 10%.

---

[1]) Richtiger das Protein der Mandeln.

[2]) Nordefeldt, Biochem. Zs 130; 1922.

[3]) Willstätter und Csányi, H. 117, 172; 1921.

Verschiedene Proben aus süssen wie aus bitteren Mandeln ergaben ziemlich übereinstimmende Zeitwerte für Amygdalinspaltung: 425, 480 und 500.

100 g Mandelpulver werden in einer Flasche mit 250 ccm n/10-Ammoniak verrührt und nach Verdünnen mit weiteren 100 ccm Wasser 5 Stunden lang mit der Maschine geschüttelt. Den ammoniakalischen Auszug trennt man am besten mittels der Zentrifuge von den Rückständen, um diese sogleich in den Zentrifugengläsern wieder mit 100 ccm Wasser unter Zusatz von 10 ccm n/10 Ammoniak anzurühren, von neuem zu zentrifugieren und ebenso einen dritten Auszug zu bereiten, abermals, falls die alkalische Reaktion verschwunden ist, unter Zusatz einiger Kubizentimeter Ammoniak. Die vereinigten Auszüge, etwa $^1/_2$ Liter, erhalten 60% der Trockensubstanz der Mandeln. Einen grossen Teil der Eiweissstoffe, etwa 8% vom Pflanzenmaterial, fällen W. u. C., wie üblich, mit verdünnter Essigsäure (300 ccm n/10 oder 60 ccm n/2) aus; der Niederschlag enthält 5—8% vom Emulsin.

Das Filtrat gibt schon mit wenig 95%igem Alkohol (30% seines Volumens) eine Fällung, die hauptsächlich aus Eiweiss und Gummi besteht, aber auch zirka 20% der Enzyme einschliesst. Trennt man diese Fraktion ab, so wird das Rohprodukt des Emulsins reiner. Aber da für das Präparat doch eine Umfällung erforderlich ist, bewährt es sich nicht, die etwas verlustbringende fraktionierte Fällung vorzunehmen. Man fällt daher die Lösung mit der vierfachen Menge Sprit und isoliert mittels der Zentrifuge den rein weissen Niederschlag, der mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen wird."

„Das Rohprodukt betrug exsikkatortrocken 2,5—3,5 g, beispielsweise vom Zeitwert 25, 22, 18, 16, was Ausbeuten von etwa 60—75% der Theorie entspricht."

„Durch die Fällung und Trocknung ist ein Teil des noch beigemengten Proteins unlöslich geworden. Daher lässt sich der Reinheitsgrad leicht durch Umscheiden verbessern. Das feine Pulver teigt man mit wenig Wasser in der Reibschale an, und spült es mit dem Dreissigfachen von Wasser in die Zentrifugengläser über, in denen die Lösung geklärt wird. Darauf fällt man das Emulsin zum zweiten Male mit Alkohol, wenn es für die Ausflockung nötig ist unter Zusatz einer Spur Kalziumchlorid. Diese Reinigung lässt sich fast ohne Verlust ausführen, die umgefällten Präparate wiesen Zeitwerte von 10—18 auf."

„Die Emulsinpräparate sind in Wasser klar löslich, hellbräunlich bei grosser Konzentration. Die Lösung wird durch Salzsäure gefällt."

Willstätters und Csányis Präparat zeigte auch nach langem Erwärmen mit Wasser keine reduzierende Wirkung auf Fehlingsche Lösung; bei langdauerndem Erwärmen mit verdünnter Säure tritt etwas Reduktionswirkung auf. Die genannten Autoren finden stets noch schwache Millon- und Biuretreaktion und Xanthoproteinreaktion; ihr Präparat vom Zeitwert 18 zeigte $[\alpha]_D = -60^\circ$.

Das von Nordefeldt durch Umfällen und Dialyse gereinigte Präparat (nur auf Oxynitrilase geprüft) ergab nach Säurehydrolyse eine Reduktion nach Bertrand, auf Glukose berechnet, von 10%. Ferner findet Nordefeldt in seinem Präparat ein Globulin[1]), vermutlich das von Osborne untersuchte Amandin. Ausserdem 5% Asche (besonders Ca- und Mg-Phosphat); eine Drehung $[\alpha]_D = -48^0$, etwas geringer als die des Amandins (vergl. S. 256 u. ff.).

Die Herstellung anderer, β-Glukosidasen und Oxynitrilasen enthaltenden Präparate findet man bei den betreffenden Enzymen behandelt.

Aus den Untersuchungen von H. E. und E. F. Armstrong und Horton[2]), sowie von Caldwell und Courtauld und ferner von Rosenthaler ging mit Sicherheit hervor, dass im Mandel-Emulsin wenigstens vier Enzyme enthalten sind, nämlich folgende:

1. Amygdalase, welche das Amygdalin in Mandelsäurenitrilglukosid und Glukose spaltet (siehe S. 161).

2. Eine β-Glukosidase (Prunase), welche Mandelsäurenitrilglukosid in Benzoylnitril und Glukose zerlegt (siehe S. 238).

3. Eine Oxynitrilase (siehe S. 253 u. ff.).

4. Eine Laktase[3]).

Nach Pottevin[4]) hydrolysieren die Emulsinpräparate aus Aspergillus niger Milchzucker und überhaupt β-Galaktoside nicht, und wurden daher als physiologisch reiner angesehen. Eine wirkliche Charakterisierung der Emulsinpräparate kann natürlich nur durch die quantitative Angabe der Wirksamkeit in bezug auf die verschiedenen Reaktionen erreicht werden. Eine grundlegende Arbeit hierüber verdankt man Willstätter und Csányi[5]), welche die Zeitwertquotienten der β-Methylglukosid-, Laktose- und Raffinosespaltung zur Amygdalinspaltung, der Laktose- zur Prunasin-, der β-Glukosid- zur Prunasinspaltung in verschiedenen Ausgangsmaterialen und Emulsinpräparaten verglichen.

B. Alkyl-β-Glukosidase.

Substrat[6]): β-Methylglukosid, $CH_3 \cdot OC_6H_{11}O_5$; die farblosen Prismen schmelzen bei 104°; $[\alpha]_D = -33^0$. Durch Säuren wird das β-Glukosid nach van Ekenstein[7]) etwa 3 mal so schnell hydrolysiert wie die α-Verbindung, nach Armstrong und Glover[8]) 1,8 mal.

---

[1]) Ohta (Biochem. Zs 58, 329; 1914) hat eine Befreiung des Emulsins von Eiweiss vorgenommen, wobei allerdings nur sehr wenig wirksame Präparate erzielt wurden (vergl. Willstätter und Csányi, S. 174). Siehe hierzu auch Hérissey, Thèses, Paris.

[2]) H. E. und E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 80, 321; 1908.

[3]) Bourquelot und Hérissey, Soc. Biol. 55, 219; 1903.

[4]) Pottevin, Ann. Inst. Pasteur, 17, 31; 1903.

[5]) Willstätter und Csányi, H. 117, 172; 1921.

[6]) E. Fischer, Chem. Ber. 26, 2400; 1893.

[7]) van Ekenstein, Rec. d. trav. Pays-Bas 13, 185; 1894.

[8]) A. E. Armstrong und Glover, Proc. Roy. Soc. B. 80, 312; 1908.

Zahlreiche andere Alkylglukoside sind beschrieben.

Allylglukosid und Bromallylglukosid werden durch Emulsin hydrolysiert (E. Fischer, H. 108). Anhydro-methyl-glukosid $CH_3 \cdot OC_6H_9O_4$, von E. Fischer und Zach[1]) dargestellt, wird nach Angabe dieser Forscher von Emulsin nicht gespalten.

Vorkommen: Die Alkyl-β-Glukosidase ist ein Bestandteil des Mandel-Emulsins, und zwar aus bitteren und süssen Mandeln. Über die weitere Verbreitung fehlen noch genauere Angaben. Bezgl. der Spezifität dieses Enzyms hat I. Bolin[2]) im hiesigen Laboratorium einige orientierende Versuche ausgeführt; ein Präparat aus den Blättern von Salix caprea erwies sich in einem Versuchsjahr aktiv gegen Salicin, aber nicht gegen β-Methylglukosid. Aus den viel eingehenderen quantitativen Versuchen von Willstätter kann auf die Verschiedenheit des β-Methylglukosides von der „Prunase" geschlossen werden.

Präparate: Über die Emulsinpräparate von Willstätter u. Csányi sowie von Helferich, welche auch an Methyl-β-Glukosid geprüft worden sind, siehe S. 226 u. ff.

Wirkungsbedingungen.

Optimale Azidität: Aus Messungen von Willstätter u. Csányi ergibt sich, dass die enzymatische Spaltung von Methyl-β-Glukosid bei pH = 3 nicht, und bei pH = 7 fast nicht vor sich geht. In einer Versuchsreihe haben diese Forscher 40 mg eines Emulsinpräparates 6 Stunden bei 30° bei Gegenwart von Azetatpuffer zur Wirkung gebracht und dabei folgende Spaltungsgrade erhalten:

pH	4,1	4,4	5,0	5,3	5,6
% Spaltung	53,6	58,1	60,4	57,3	53,6.

Als pH-Optimum geben Willstätter und Csány 4,7—5,1 an.

Paralysatoren: Sowohl Toluol als Chloroform lassen die Wirksamkeit ungeändert; β-Glukosidase ist gegen aliphatische Alkohole bedeutend resistenter als das α-Enzym.

Kinetik.

Der zeitliche Verlauf der Hydrolyse in Methylalkohol und Glukose ist unter Einhaltung optimaler Aziditätsbedingungen von Willstätter und Csányi (l. c.) untersucht worden:

0,8% Glukosidlösung; 100 mg Emulsin; pH = 4,4; Temperatur 30°.

Stunden	% gespalten	$k \cdot 10^4$
2	7,1	370
16	48,35	410
19	57,45	450
23	62,0	420
26	65,4	410
41	81,0	400
48	84,2	380

[1]) E. Fischer u. Zach, Chem. Ber. 45, 456; 1912.

[2]) I. Bolin, H. 87, 182; 1913.

Was den Einfluss der Enzymkonzentration betrifft, so geben die genannten Autoren 2 Versuchspaare an; nach diesen ist für eine etwa 40%ige Spaltung das

Produkt aus Zeit × Emulsinmenge = Konst.

Versuch	mg Emulsin	Stunden	% gespalten
1a	10	15	42,65
1b	50	3	43,35
2a	100	2	37,6
2b	200	1	37,5

Enzymatische Synthesen.

Die Kenntnis der synthetischen Wirkungen des Emulsins und den endgültigen Nachweis, dass eine Glukosidase das Gleichgewicht zwischen Methylalkohol (sowie seinen Homologen) und Glukose von beiden Seiten her einstellt, verdankt man E. Bourquelot und seinen Mitarbeitern, von denen hier besonders Hérissey und Bridel zu nennen sind.

Durch zahlreiche Experimente wurde gezeigt, dass es sich in jeder Hinsicht um echte Gleichgewichte handelt. Bourquelot and Bridel gingen z. B. von folgender Lösung aus:

β-Methylglukosid (entsprechend 2 g Glukose)	2,1555 g
Methylalkohol	10
Wasser	100
Emulsin in Pulverform	0,30

Die unmittelbar einsetzende Hydrolyse kam zum Stehen, als die Anfangsdrehung $-1^{0}26'$ ($l = 2$) in $+1^{0}20'$ übergegangen war, wobei aus 1,6934 g Methylglukosid 1,5712 g Glukose gebildet worden waren. Weiterer Emulsinzusatz änderte das Gleichgewicht nicht.

Ein Parallelversuch zum oben genannten wurde mit einer Lösung begonnen, welche 2 g Glukose im entsprechenden Alkohol-Wassergemisch enthielt; er kam von der Anfangsdrehung 2^{0} auf $+1^{0}12'$.

Entfernte man einen Teil der Glukose aus der Lösung, was durch Zusatz von Hefe geschehen konnte, so schritt die Hydrolyse bis zum Eintritt eines neuen Gleichgewichtes weiter.

Ein weiterer Versuch ist in folgender Tabelle zusammengestellt; er bezieht sich auf eine Lösung, welche 30,2 Vol.-% Methylalkohol enthält.

Von beiden Seiten her wird also die gleiche Enddrehung (Mittel 11′) erreicht.

Den Einfluss der Alkoholkonzentration sehen wir aus der Kurve, welche bereits im I. Teil (S. 219, Fig. 29) dargestellt worden ist. Sie zeigt, dass bei

hohem Alkoholgehalt (z. B. 95 %) der grösste Teil der Glukose im Gleichgewicht in Glukosid verwandelt ist.

Synthese.

1 g Glukose in 100 ccm

Versuchstage	Drehung (2 dm)
0	+ 64′
1	+ 58′
2	+ 48′
4	+ 40′
8	+ 28′
13	+ 16′
18	+ 12′

Hydrolyse.

1,077 g Methylglukosid in 100 ccm

Versuchstage	Drehung (2 dm)
0	— ,2′
1	— 36′
2	- 26′
4	— 18′
8	— 6′
13	+ 6′
18	+ 10′

Sehr interessant sind Bourquelots und Bridels[1]) Versuche über die gleichzeitige Einwirkung von α- und β-Glukosidase auf wässrig-alkoholische Lösungen von Glukose. Untersucht man unter gewissen Konzentrationsbedingungen (1 g Glukose, 20 g Äthylalkohol in 100 ccm wässeriger Lösung) die Gleichgewichte zwischen Glukosid und Glukose für jede der beiden Glukosidasen getrennt, so erhält man:

für α-Äthylglukosid $32{,}6\ /67{,}4 = k_a$

„ β-Äthylglukosid $23{,}30/76{,}61 = k_b$

und zwar sind die Werte beider Konstanten in weiten Grenzen unabhängig von der absoluten Konzentration der Glukose[2]).

Bezeichnet man für ein gegebenes Lösungsvolum (etwa 100 ccm) mit

q die Gesamt-Menge Glukose (frei und gebunden)

x die Menge von α-Äthylglukosid
y „ „ „ β-Äthylglukosid } im Gleichgewicht,
z „ „ der freien Glukose

so gilt die Gleichung: $x + y + z = q$.

Ferner gilt, wenn k_a und k_b wie oben Gleichgewichtskonstanten bezeichnen, allgemein

für α-Äthylglukosid $x = k_a \cdot z$

„ β-Äthylglukosid $y = k_b \cdot z$

somit

$$k_a z + k_b z + z = q \text{ und also } z = \frac{q}{k_a + k_b + 1}.$$

Die im Gleichgewicht frei gebliebene Glukosemenge ist also nach gleichzeitiger Einwirkung der beiden Glukosidasen gleich der Menge der angewandten Glukose, dividiert durch $1 + k_a + k_b$.

[1]) Bourquelot und Bridel, Jl de Pharm. et de Chim. (7) 9, 104, 155, 230; 1914. — 10, 361, 393; 1914.

[2]) Man könnte daran denken, aus den beiden obigen k-Werten die relativen Mengen α- und β-Glukose in der Lösung zu berechnen, was aber durch die ev. Anwesenheit einer weiteren Form (Lowry, Jl Chem. Soc. 83, 1314; 1903) erschwert wird.

Zur Prüfung dieser Formel wurde u. a. folgende Mischung hergestellt, welche bei Zimmertemperatur (15°—19°) das Gleichgewicht erreichte.

	Glukose	1,9935	g
	Äthylalkohol	20,0	g
	Wasser	50	ccm
Dazu:	Mazeration (1:10) getrockneter Unterhefe	20	ccm
	Emulsin[1])	0,3	g
	Wasser zu	100	ccm

Für diese Lösung berechnet sich der Wert z:

$$z = \frac{1{,}9935\ \text{g}}{\frac{32{,}6}{67{,}4} + \frac{23{,}39}{76{,}61} + 1} = 1{,}1143\ \text{g}.$$

Folgende Drehungen wurden erhalten:

Versuchsdauer Tage	Drehung	Freie Glukose
0 (Beginn)	2° 6′	1,9935 g
2	2° 22′	—
8	2° 56′	1,240 „
16	2° 46′	1,134 „
28	2° 44′	1,1164 „
36	2° 44′	1,1164 „

Es zeigt sich also zwischen dem für freie Glukose berechneten Werte 1,1143 und dem hier gefundenen, 1,1164 vollständige Übereinstimmung.

Berechnet man die Werte für x und y, so findet man

für x: 0,5388 entsprechend 0,622 g α-Äthylglukosid
„ y: 0,340 „ 0,393 g β-Äthylglukosid.

Für die Mischung 1,1143 g Glukose + 0,622 g α-Äthylglukosid + 0,393 g βAthylglukosid

Drehung berechnet 2° 45′
„ beobachtet 2° 44′.

Die Reihe der schon 1914 von Bourquelot und seiner Schule synthetisierten Alkohole findet man im I. Teil S. 223. Die Gleichgewichtskonstanten scheinen sich für Methyl-Äthyl- und Propylalkohol nicht stark zu unterscheiden.

Einfluss der Substitution im Glukoserest auf die Spaltung.

Wie schon im Teil I (S. 247) erwähnt wurde, hat E. Fischer[2]) bemerkenswerte Tatsachen gefunden, welche zeigen, dass Substitution am Glukoserest die enzymatische Spaltbarkeit von β-Methylglukosiden stark beein-

[1]) Die beiden Enzyme wirken nicht unter ihrem etwas verschiedenen (pH = 6,4 bzw. 5,0) Aziditätsoptimum; immerhin dürften beide nicht allzu weit von diesem Optimum entfernt gewesen sein.

[2]) E. Fischer, H. 107, 176; 1919.

flussen; so wird aus β-Methylglukosid-6-bromhydrin der Methylalkohol durch Emulsin nicht freigemacht, während bei β-Methyl-d-iso-rhamnosid die entsprechende Spaltung ebenso unbehindert vor sich geht, wie beim β-Methylglukosid selbst.

In diesem Zusammenhang mag auch noch erwähnt werden, dass nach Fischer[1]) β-Methyl-Xylosid von Emulsin ebensowenig angegriffen wird wie die entsprechende α-Verbindung. (Vgl. auch Kap. 9.)

Temperatureinfluss.

Nach einigen Angaben (ohne Zahlenbelegen) von H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton (l. c.) behält Mandel-Emulsin auch nach mehrstündigem Erhitzen der Lösung auf 55° seine Wirkung auf Methylglukosid bei: als Zerstörungstemperatur wird 59° angegeben.

In alkoholischer Lösung, in welcher das Enzym nicht ausgefällt ist, tritt nach Bourquelot u. Bridel[2]), die Inaktivierung bei um so niedrigerer Temperatur ein, je höher die Alkoholkonzentration ist. Ausgefälltes Enzym (60—95% Alkohol) ist im allgemeinen widerstandsfähiger gegen höhere Temperaturen[3]).

Als sekundären Alkohol hat Bourquelot den Isopropylalkohol in den Kreis seiner Untersuchungen gezogen und ein β-Glukosid erhalten (l. c. 1915). Auch was die β-Alkyl-Glukoside mehrwertiger Alkohole betrifft, so verdankt man Bourquelot[4]) eine eingehende Untersuchung.

Van 't Hoff[5]) hat das enzymatische Gleichgewicht des von Fischer[6]) als Sirup dargestellten Glyceringlukosides, vermutlich des Monoglukosides, untersucht.

„Versuche mit dem Molekularverhältnis zwischen Glukose und Glyzerin 1:4 wurden mit steigenden Wassermengen versetzt; ist dieselbe (im ganzen) in Molekülen b, und der umgewandelte Glukosebruchteil a, so entspricht:

$$K = \frac{\text{Glukosid} \times \text{Wasser}}{\text{Glukose} \times \text{Glyzerin}} = \frac{a\,(b + a)}{(1-a)\,(4-a)}.$$

Glukosidbildung fand noch statt für b = 15 und a = 0,38, was für obigen Wert 2,6 bringt, so dass jedenfalls K grösser ist als 1. Im molekularen Verhältnis würden also Glyzerin und Glukose bis etwa 70% sich umwandeln können."

Eingehender hat Bourquelot die β-Glukosidbildung des Glyzerins (l. c. S. 371) studiert, und ist dabei zu zwei Monoglukosiden nämlich einem primären und einem sekundären gelangt (l. c. S. 376).

Von übrigen von diesem Forscher erhaltenen Glukosiden sei das Glykolglukosid (mit Bridel, C. r. 158) erwähnt.

---

1) E. Fischer, Chem. Ber. 45, 3761; 1912. — H. 26. 68; 1898. — Siehe hierzu die Bemerkung H. 107, S. 191.

2) Bourquelot u. Bridel, C. r. 155, 319; 1912. — Jl Pharm. et Chim. (7) 7, 27; 1913.

3) Dass ausgefällte Glukosidase überhaupt noch wirksam ist betont besonders Bayliss (Jl of Physiol. 50, 85; 1915).

4) Bourquelot, Ann. de Chim. et Phyd. (9) 4, 310; 1915. — Siehe auch Bourquelot Bridel u. Aubry, C. r. 160, 823; 1915.

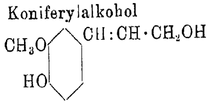
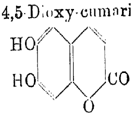
5) van 'tHoff, Sitz. Ber. Preuss. Akad. 48, 963; 1910. — Siehe hierzu auch Versuche von Bayliss, Jl of Physiol. 43—46; 1912—1913, die aber Bourquelot (Ann. de Chim. et Phys. (9) 4 nicht bestätigen konnte.

6) Fischer u. Beensch, Chem. Ber. 27, 2478; 1894.

C. β-Glukosidasen von Phenolen und CN-freien Phenolderivaten (Phenyl-β-Glukosidasen).

1. Substrate.

Ebensowenig wie die Stellung der Phenyl-β-Glukosidasen zu den Alkyl-β-Glukosidasen geklärt ist, kann die Einheitlichkeit der erstgenannten Gruppe als sichergestellt angesehen werden. Diejenigen Substrate, an welchen die enzymatische Spaltbarkeit besonders geprüft ist, können nach den aromatischen Komponenten etwa so gruppiert werden, wie in der ersten Spalte der folgenden Tabelle geschehen ist. Daneben ist als Beispiel eine typische Glukosidkomponente und das entsprechende Glukosid nebst dessen Vorkommen angegeben.

Gruppe	Aromat. Teil	Glukosid	Vorkommen
I. Phenole	Phenol	Phenylglukosid	Synth. Fischer und Armstrong, Chem. Ber. 34
	Hydrochinon	Arbutin	Ericaceen, Blätter
II. Aromat. Alkohole	Benzylalkohol	Benzylglukosid	Synth. Fischer, Chem. Ber. 26 u. 27. Fischer und Helferich, Lieb. Ann. 383
	Salizylalkohol $HO \cdot C_6H_4 \cdot CH_2OH$	Salicin	Salix und Populus, Blätter
	Koniferylalkohol 	Koniferin	Kambialsaft der Koniferen
III. Phenolaldehyd	$HO \cdot C_6H_4 \cdot CHO$	Spiraein	Spiraea
IV. Phenolsäuren u. deren Ester	$CH_3CO_2C_6H_4 \cdot OH$	Betulin, Gaultherin	Betula lenta, Rinde u. a.
	4,5-Dioxy-cumarin 	Äskulin	Äskulus, Rinde

Hieran reihen sich die Enzyme spezieller Glukoside, wie der Rubierythrinsäure, der Anthozyane, Saponine, des Indikans.

Bekanntlich haben mehrere Enzymchemiker die Existenz zahlreicher, auf spezielle Glukoside spezifisch wirkender Enzyme angenommen. So hat Sigmund geglaubt, aus seinen Versuchen den Schluss ziehen zu können, dass Salicin durch eine spezifische Salikase gespalten wird, ebenso Arbutin durch eine Arbutase, Äskulin durch eine Äskulase, Populin durch eine Populase, Gaultherin bzw. Betulin durch eine Gaultherase bzw. Betu-

lase, Phlorizin durch eine Phlorizinase. Weiter findet man in der Literatur die Enzym-Namen Elaterase, Primiverase u. a.

Bezüglich dieser hypothetischen Enzyme in Pflanzen mag folgender Hinweis auf die früheren Arbeiten genügen:

Enzym	Vorkommen	Verfasser	Schriftstelle
Salikase	Salix und Populus	Sigmund	Wien. Sitz.-Ber. I, 117, 1213; 1908 Monatsh. f. Chem. 30, 77; 1909
	Salix und Populus	Weewers	Rec. Trav. bot. Néerl. 7, 1; 1910
		Bolin	H. 87, 182; 1913
	Verschiedene Pflanzen	H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton	Proc. Roy. Soc. B. 85, 363; 1912
	Kürbis	Krauch	Landw. Versuchsst. 23, 77
Arbutase	Calluna- und Vaccinium-Arten	Sigmund	Wien. Sitz.-Ber. I, 117, 1213; 1908
		Fichtenholz	Soc. Biol. 66, 830; 1909 Jl de Pharm. et de Chim. 30, 199; 1909
	Grevillea robusta Birnbaumblätter	Bourquelot und Fichtenholz	C. r. 151, 81; 1910 Jl de Pharm. et de Chim. (7) 2, 97; 1910. — 4, 145, 441; 1911. — 5, 425; 1912
		Bourquelot und Hérissey	C. r. 146, 764; 1908 Jl de Pharm. et de Chim. 27, 421; 1908
Populase	Salix	Sigmund	l. c.
	Populus	Weewers	l. c.
	Aspergillus	Hérissey	Thèse, 1899
Betulase oder Gaultherase	Betula, Spiraea ulmaria, Gaultheria procumbens, Monotropa, Hypopitys, Polygala vulg. u. a.	Bourquelot[1])	Jl de Pharm. et de Chim. (6) 3, 577; 1896
	Betula	Schneegans und Gerock	Arch. de Pharm. 232, 437; 1894
		Beijerinck	Zentralbl. f. Bakt. II, 5, 425; 1899
Äskulase	Äskulus, Rinde und Samen	Sigmund	Monatsh. f. Chem. 31, 657; 1910
Primiverase	Primula officinalis u. andere Primulaceen	Goris u. Maseré	C. r. 149, 947; 1909
Elaterase (Existenz sehr fraglich)	Ecballium elaterium	Berg	Soc. Biol. 71, 74; 1911 C. r. 154, 370; 1912

[1]) Nach Bourquelot ist der Entdecker Procter.

Die Annahme einer Verschiedenheit dieser Enzyme vom „Emulsin" der Mandeln hat insofern eine gewisse Berechtigung gehabt, als das Mandelemulsin Enzyme enthält, welche nicht auf Phenyl-β-Glukoside wirken, z. B. Amygdalase, so dass man also sehr wohl durch ein Enzympräparat, welches verhältnismässig reich an Amygdalase ist, aus Amygdalin Glukose abspalten kann, während eine Wirkung auf Salicin nicht erkennbar ist.

Es ist nicht unwahrscheinlich, dass dasjenige Enzym, welches Glukose von der primären Alkoholgruppe eines Phenolalkohols abtrennt, den eigentlichen Alkyl-β-Glukosidasen nahe steht und verschieden ist von demjenigen Enzym, welches Phenylglukoside, wie Arbutin, spaltet.

Auch das Enzym, welches die Glukosidbindung der Nitrilglukoside angreift, die sog. Prunase, soll einstweilen als besonderes Enzym behandelt werden.

Spezifität in dem Sinne aber, dass jedem β-Glukosid sein eigenes Enzym zukommt und somit den Substraten Salicin, Arbutin, Äskulin je ein besonderes Enzym entspricht, braucht auf Grund der vorliegenden Tatsachen noch nicht angenommen zu werden. Verf. ist mit der Prüfung dieser Frage beschäftigt und möchte daher noch keine endgültige Entscheidung treffen, glaubt aber von einer Phenyl-β-Glukosidase sprechen zu können im selben Sinne wie von einer Esterase oder Ereptase.

Als Substrat zur Untersuchung der Phenyl-β-Glukosidase scheint das neuerdings wieder von Helferich[1]) verwendete Salicin recht geeignet. Erweisen sich im Lauf der Zeit die Phenyl-β-Glukosidasen wirklich als ein einheitliches Enzym, so kann vielleicht später die Bezeichnung Salikase statt Phenyl-β-Glukosidase (der Kürze wegen) gebraucht werden.

Emulsin spaltet auch Chlor- und Bromderivate des Salicins.

Eine eingehende Untersuchung über den Einfluss der Struktur auf die Wirkung des „Emulsins" verdankt man E. Fischer und seinen Mitarbeitern, besonders Helferich. Die älteren Ergebnisse, bei welchen die Azidität der Lösungen oft von der für Emulsin optimalen weit entfernt war, bedürfen, wie Fischer bemerkt, einer Nachprüfung. Bei Fischers Versuchen hat sich schliesslich gezeigt, dass bei Einhaltung geeigneter pH-Werte die meisten β-Glukoside durch Emulsin gespalten werden.

Besondere Verhältnisse liegen bei den Glukosidosäuren vor (H. 107, S. 181): Die freien Säuren werden offenbar nur langsam gespalten, die Salze schneller und ohne Einfluss der Kationen. Von den Derivaten sind die Ester, Amide und Nitrile am leichtesten hydrolysierbar; für die Glukosidoglykolsäure ist im I. Teil dieses Buches, S. 246 eine kleine Tabelle über beobachtete Spaltungsgrade angegeben.

„Die Derivate der Glukosido-β-Oxyisobuttersäure sind auffallend resistent; denn die Salze zeigen kaum eine Spaltung und auch bei Ester, Amid und

[1]) Helferich, H. 117, 159; 1921.

Nitril (Linamarin) geht die Hydrolyse sehr langsam vonstatten. (Bei dem Nitril war diese Erscheinung schon von Armstrong und Horton beschrieben). Offenbar hängt dies zusammen mit der Bindung des Zuckerrestes an das tertiäre Kohlenstoffatom. Auch bei dem Amylenhydratglukosid, wo ebenfalls der Zuckerrest an eine tertiäre Alkoholgruppe gebunden ist, findet die Hydrolyse durch Emulsin verhältnismässig langsam statt."

Bei der Glukosidomandelsäure besteht ein Unterschied zwischen den Derivaten der d- und l-Mandelsäure. Denn die Salze und das Amid der d-Mandelsäure werden nicht angegriffen. Dagegen werden die Salze der l-Verbindung offenbar gespalten, wie die Versuche mit dem Gemisch der beiden Glukosidomandelsäuren zeigen.

„Noch merkwürdiger ist das Verhalten der Methylester. Auch hier werden die Derivate beider Mandelsäuren durch Emulsin gespalten." Die Bildung von d-Mandelmethylester aus dem Glukosido-dMandelester ist durch enzymatische Hydrolyse experimentell festgestellt; eine tautomere Form ohne asymmetrisches Kohlenstoffatom kann also hier nicht entstehen. Wie Fischer hervorhebt, verdient also der Fall des Glukosido-d-Mandelsäuremethylesters bei allgemeinen stereochemischen Betrachtungen über Zusammenhang von Enzymwirkung und Konfiguration eine besondere Berücksichtigung[1]).

Bereits im I. Teil ist auf die auffallende Tatsache aufmerksam gemacht worden, dass β-Methylglukosid und β-Methyl-d-iso-rhamnosid von Emulsin gespalten werden, während β-Methylglukosid-6-bromhydrin nicht spaltbar ist; wie die folgende schematische Formel zeigt, steht das Bromhydrin in der Mitte zwischen den beiden anderen Glukosiden.

$R \cdot OCH_3$	$R \cdot OCH_3$	$R \cdot OCH_3$
•	•	•
CH_2OH	CH_2Br	CH_3
β-Methylglukosid spaltbar	β-Methylglukosid-6-bromhydrin nicht spaltbar	β-Methyl-d-iso-rhamnosid spaltbar

Auf das Verhalten der beiden Xyloside kommen wir im Kapitel 9 noch zurück.

Einteilung.

Spaltungen von Phenyl-β-Glukosiden sind auch in tierischen Organen beobachtet worden. Wir wollen zunächst die hierüber vorliegenden Angaben zusammenfassen, bevor wir die weit wichtigeren pflanzlichen Enzyme behandeln.

2. Tierische Phenyl-β-Glukosidasen.

Genauere Angaben über diese Enzyme oder ihre Wirkungsart liegen nicht vor, sondern meist nur Beobachtungen über ihr Vorkommen, also An-

[1]) Eine ausgeprägt spezifische Auswahlfähigkeit zwischen zwei Antipoden habe Karrer, Nägeli und Smirnoff neuerdings beim Umsatz von dl-Azetobromglukose mit dem Silbersalz der dl-Mandelsäure beobachtet. (Helv. 5, 141; 1922).

Tiere u. spaltende Organe	Gespalt. Glukosid	Bemerkung	Beobachter	Schriftstelle
Kaninchen, Katze, Hund; Leber und Niere	Salicin, Arbutin, Helicin	egative Resultate mit Organextrakten	Grisson	Diss. Rostock, 1887; Malys Jahresb. 17
Pferd, Kaninchen; Leber und Niere	Salicin	Wirksam ist die wässerige Enzymlösung, nicht die alkohol. Fällung	Gérard	Soc. Biol. 53, 99; 1901
Nur in Niere von Pferd, nicht Hund, Kaninchen, Rind, Schaf	Phlorizin		Charlier, i. Anschluss an Arbeiten von Minkowski	Soc. Biol. 53, 494; 1901
Rinds-, Hasen-, Hunde- und Pferdeleber	Arbutin	Nur kolorim qualitat. Prüfung auf Glukose (unsicher)	Gonnermann	Pflüg. Arch. 113, 168; 1906
Leber und Niere von Pflanzenfressern (Kaninchen, Hammel, Rind, Schwein)	Salicin	Bei Fleischfressern (auch Mensch) mit Leber und Niere höchstens schwache Wirkung [1])	K. Omi	Biochem. Zs 10, 258; 1908
Kaninchen und Hund	Salicin	Ausscheidung v. Ätherschwefelsäure nach Eingabe von Salicin	Kusumoto	Biochem. Zs 10, 264; 1908
Menschl. Plazenta; Leber und Niere v. Kaninchen	Salicin, Arbutin, Helicin		Higuchi	Biochem. Zs 17, 21; 1909
Leber und Niere v. Katze, Schwein, Kaninchen, nicht Mensch	Salicin, Arbutin		R. Bass	Zs f. exp. Path. 10, 120; 1911
Stierhoden	Salicin	Schwache Wirkung	Mihara	H. 75, 443; 1911
Hirn von Mensch, Kaninchen, Meerschweinchen	Arbutin		Leo Hess	Wien. klin. Wochenschr. 24, 1009, 1911
Darm höherer Tiere	Salicin ('	Bei vielen Tieren erfolgt die Spaltung im Darm durch Bakterien	Thomas u Frouin	Ann. Inst. Pasteur, 23, 261; 1909
		Avertebraten.		
Krebse	Salicin		Kobert	Pflügers Arch. 99, 116; 1903
	Populin, Phlorizin		Giaja und Gompel	Soc. Biol. 62, 1197; 1907
Zahlreiche Käfer, Puppen, Kanthariden, Würmer	Salicin, Arbutin		Kobert	l. c.

[1]) In der Leber von Hunden wurde nach Exstirpation des Pankreas eine Salicinspaltung beobachtet, die sich bei normalen Hunden nicht zeigte.

gaben, dass gewisse β-Glukoside von gewissen Organen gespalten worden sind[1]). Der Übersichtlichkeit wegen seien deshalb die Ergebnisse, zu welchen die verschiedenen Beobachter gekommen sind, tabellarisch zusammengefasst. Dazu muss aber bemerkt werden, dass das den Angaben zugrunde liegende Tatsachenmaterial manchmal recht dürftig und unsicher erscheint. Negative Resultate können natürlich auch oft durch ungeeignete Azidität der Lösung veranlasst sein.

Über die Wirkungsbedingungen der tierischen β-Glukosidasen ist, wie erwähnt, nichts bekannt. Es bleibt zu untersuchen, ob sich nicht die Aziditätsbedingungen dieser tierischen β-Glukosidasen von denen der pflanzlichen in ähnlicher Weise unterscheiden, wie dies bei den Saccharasen nachgewiesen ist.

3. Pflanzliche Phenyl-β-Glukosidasen.

Vorkommen.

Zunächst sei auf die S. 211 gemachten Angaben über das Vorkommen von „Emulsin" verwiesen. Da eventuelle Besonderheiten einzelner Enzyme dieser Gruppe noch nicht festgestellt sind, kann auch über Vorkommen spezieller Phenylglukosidasen einstweilen nichts gesagt werden; im allgemeinen wird man besondere Enzyme in den gleichen Pflanzenorganen suchen, welche die entsprechenden Glukoside in grösserer Menge enthalten.

Malzextrakt spaltet nach van Laer[2]) Salicin nicht.

Die Glukosidspaltung durch Kryptogamen wurde von Bourquelot[3]) nachgewiesen, und zwar greifen sowohl höhere als niedere Pilze, Hefen und Bakterien Phenyl-β-Glukoside an. Hérissey fand eine Glukosidase in Moosen[4]) und Flechten[5]); ähnliches fand Heut[6]).

Bourquelot[7]) gibt ein Verzeichnis derjenigen höheren Pilze, bei welchen er Spaltung von Salicin und Koniferin (und Amygdalin) nachweisen konnte; darunter befinden sich Hydnum cirrhatum, Fuligo varians, Auricularia sambucina, Polyporus fomentarius; für die beiden letzteren werden die Versuche ausführlicher beschrieben. Ausser einer Beobachtung an Agaricus campestris von Kobert (Lehrb. d. Intox.) ist noch eine Untersuchung von Zellner[8]) zu erwähnen, welcher Spaltung von Salicin und Koniferin, nicht von Phlorizin, durch Holzpilze fand.

[1]) Es ist seit langem bekannt, dass Säugetiere nach Eingabe von Salicin Salicylsäure im Harn ausscheiden, welche als Oxydationsprodukt des Salicylalkohols angesehen wird.

[2]) van Laer, Soc. Biol. 84, 471; 1921.

[3]) Bourquelot, Soc. Biol. 45, 653, 804; 1893. — Bull. Soc. Mycol. France 9, 189, 230; 1893. — 10, 49; 1894. — 11, 235; 1895.

[4]) Hérissey, Soc. Biol. 50, 532; 1898.

[5]) Hérissey, Bull. Soc. Mycol. France 15, 44; 1899.

[6]) Heut, Arch. d. Pharm. 239, 581; 1901.

[7]) Bourquelot, C. r. 117, 383; 1893.

[8]) Zellner, Wien. Sitz.-Ber. IIb, 118, 439; 1907.

Auch bezüglich des Vorkommens in niederen Pilzen, besonders Schimmelpilzen, stammen die ersten gründlichen Untersuchungen von Bourquelot und Hérissey[1]), Behrens[2]) (Botrytis vulg., Monilia fructigena u. a.) und Klebs[3]). Ein biologisch reineres Enzympräparat gewinnt man nach Pottevin aus Aspergillus niger; das Aspergillus-Emulsin spaltet nämlich nur β-Glukoside, keine β-Galaktoside und keinen Milchzucker (vgl. S. 214).

Helicin wird nach Schäffer (Diss. Erlangen 1901) durch Mucoreen zerlegt. Salicinspaltung durch Ober- und Unter-Hefen wiesen Henry und Auld[4]), Bokorny sowie besonders Neuberg und Färber nach (vgl. S. 211 u. 241).

Besondere Aufmerksamkeit verdient die enzymatische Spaltung des Lignins wegen seiner Beziehung zum Koniferylalkohol (Peter Klason).

Unter den zahlreichen Angaben über Hydrolyse von Glukosiden durch Bakterien seien die von Gonnermann[5]) (Darmbakterien) mit Salicin und Arbutin angestellten erwähnt, diejenigen von van der Leck[6]) über Äskulinspaltung durch B. coli und besonders eine eingehende, von Twort[7]) an 49 Glukosiden angestellte Untersuchung mit Typhoid-Kolibakterien. Dabei wurden Salicin, Arbutin, Koniferin, Phlorizin und 23 andere angegriffen.

Darstellung (siehe auch S. 210).

Aus Pflaumenkernen. Helferich[8]) zerreibt 1,75 kg Kerne mit 4,4 l Wasser, verrührt zum Brei und lässt mit 290 ccm Toluol 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Das Filtrat liefert bei der Alkoholfällung eine wirksamere Substanz, wenn es längere Zeit (etwa 9 Wochen) aufbewahrt war. Nach dieser Zeit wurde die filtrierte Flüssigkeit auf das Dreifache mit Wasser verdünnt, wobei eine starke Trübung auftrat, und durch ein Zsigmondyfilter von de Haen (Porenweite 1 oder 5) ultrafiltriert. Die klare Flüssigkeit wird dann in die 10fache Menge 95%igen Alkohols unter Umschütteln eingegossen. Nach 20 Stunden wurde vom Niederschlag dekantiert und dieser abgesaugt, unter möglichst beschränktem Luftzutritt mit absolutem Alkohol behandelt und im Exsikkator getrocknet. Das trockene, weisse Präparat war nur mehr mässig hygroskopisch. Ausbeute 28 g aus 3 l ursprünglicher Lösung (E I).

Reinigung (nach Helferich).

Präparat E I wurde in 185 ccm Wasser gelöst; beim Reiben kristallisiert viel Magnesiumphosphat aus. Nach zweistündigem Aufbewahren bei 0° wurde

---

[1]) Bourquelot und Hérissey, C. r. 121, 693; 1895.
[2]) Behrens, Zbt. Bakt. II, 4, 514; 1898.
[3]) Klebs, Jahrb. wiss. Bot. 32, 1; 1898.
[4]) Henry und Auld, Proc. Roy. Soc. B 76, 568; 1905.
[5]) Gonnermann, Pflügers Arch. 113, 168; 1906.
[6]) v. d. Leck, Zbt. Bakt. II, 17, 366; 1907.
[7]) Twort, Proc. Roy. Soc. B. 79, 329; 1907.
[8]) Helferich, H. 117. 159, und zwar 166; 1921.

der Niederschlag abgesaugt, das dunkel gefärbte Filtrat wurde mit 950 ccm Wasser verdünnt und diese Lösung in das 10fache Vol. 95 %igen Alkohols gegossen. Ausbeute 12,1 g (Präp. E II). Durch 16stündige Dialyse (Fischblase) schritt die Reinigung fort; nach Entfernung eines geringen Niederschlags wurde unter 4 mm Druck konzentriert, filtriert und wieder mit der 10fachen Alkoholmenge gefällt. Die abzentrifugierte Fällung wurde nochmals in ähnlicher Weise umgefällt; Ausbeute: 0,4 g (Präp. E III). Durch eine weitere Umfällung ergab sich Präp. E IV [1]).

Die Wirksamkeit der Präparate zeigt sich in folgender Zusammenstellung:

Präparat	$k \cdot 10^4$	Zeitwert
E I	26,3	114
E II	53,6	56,1
E III	88,8	33,9
E IV	120,2	25,05
käufl. Emulsin Kahlbaum	8,82	341

Wirkungsbedingungen.

Als optimale Azidität für die Spaltung von β-Glukosiden wurde im I. Teil, S. 35 nach dem Befund von E. Fischer (H. 107) pH = 5 angegeben. E. Vulquin [2]) kam zu dem Ergebnis, dass für die Salicinspaltung ein höherer Säuregrad (pH = 4,4) günstig ist, als für die Hydrolyse des Amygdalins (pH = 5,4—5,7). Helferich stellte seine Versuche bei $h = 1{,}7 \cdot 10^{-5}$, also pH = 4,8 an (Puffer: Na-Azetat + Essigsäure).

Über spezifische Aktivatoren oder Paralysatoren ist wenig bekannt [4]). Ohne Einfluss sind Borsäure in kaltgesättigter Lösung (nach Agulhon (C. r. 148) und H_2S nach Fermi und Pernossi [3]).

Kinetik.

Grundlegende Versuche verdankt man Tammann [4]), welcher die Wirkung des Emulsins nicht nur auf Amygdalin, sondern auch auf Salicin, Arbutin und Koniferin untersucht hat.

Zersetzung von Salicin durch Emulsin.

t Stunden	gef.	ber.	k
1	87	88	0,061
3	68	67	0,057
5	42	52	0,075
8	35	35	0,058
12	24	21	0,052
26	9	3	0,040

[1]) Analysen von Emulsinpräparaten sind vor längerer Zeit von A. Schmitt und von Bull ausgeführt worden. Diese an Präparaten von geringer und unbekannter Wirksamkeit gewonnenen Zahlen sind ohne Wert.

[2]) Vulquin und Martini, Soc. Biol. 70, 270 u. 763; 1911.

[3]) Fermi und Pernossi, Zs f. Hyg. 18, 83; 1894.

[4]) Tammann, H. 16, 298; 1891. — Zs f. physik. Chem. 18, 435; 1895.

Der zeitliche Verlauf ergibt sich nach Tammanns Versuchen an Salicin als monomolekular.

Bemerkenswerte Fortschritte sind von Hudson und Paine[1]) erzielt worden, welche ebenfalls Salicin als Substrat verwendet haben.

Bei der Verfolgung der Reaktion auf polarimetrischem Wege haben sie die Tatsache berücksichtigt, dass bei der Spaltung β-Glukose entsteht und auch die Azidität der Lösung konstant zu halten versucht; die von ihnen angegebene optimale Azidität (0,005 Mol. HCl per Liter, also pH = 2,3) ist allerdings viel zu gross, in Wirklichkeit dürfte ein grosser Teil ihrer Salzsäure durch das Emulsin neutralisiert worden sein.

nuten	Spez. Drehung (alkal. Lösung)	$k \cdot 10^4$	Temp. 30° Salicin: 5%
0	— 62,0°	—	
10	— 54,5	36	
20	— 48,7	33	
30	— 41,6	35,3	
35	— 39,5	33,9	
85	— 15,8	37,4	
145	+ 2,9	35	
∞	+ 32,2	—	

Die polarimetrischen Beobachtungen, welche Henri (Thèses, Paris 1903) an Salicin angestellt hat, sind wegen des störenden, nicht berücksichtigten Einflusses der Mutarotation der Glukose nicht verwertbar.

Herzog[2]) fand bei Versuchen mit 0,07 normaler Salicinlösung bei 25° Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung, welche mit der Zeit abnahmen:

Minuten	24	54	86	210	270	371
$k \cdot 10^4$	34,5	34,8	30,2	24,3	24,0	22,0.

Bezüglich der von Herzog aufgestellten Theorie sei auf die Originalarbeit verwiesen. Einige weitere Versuche teilt Visser[3]) mit.

In 50 ccm Lösung	Drehung °	Minuten	$k \cdot 10^4$	Zeitwert
—	— 2,51	0 (Anfang)	—	—
—	+ 1,33	∞ (Ende)	—	—
0,0709 g Emulsin Kahlbaum	— 1,98	120	5,38	560
„	— 1,49	240	5,59	539
„	— 1,02	360	5,92	508
0,1000 g E II	— 2,00	10	61,9	48,6
„	— 1,57	20	61,0	49,4
„	— 0,87	40	60,5	49,8
„	— 0,34	60	60,3	49,9
„	+ 0,22	90	59,9	50,3
„	+ 0,56	120	58,2	51,8
„	+ 0,80	150	57,3	52,5
„	+ 0,94	180	55,2	54,6

[1]) Hudson und Paine, Jl Amer. Chem. Soc. 31, 1242; 1909.

[2]) R. O. Herzog, K. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam, 1903, 332. — Zs f. allgem. Phys. 4, 163; 1904.

[3]) Visser, Zs f. physik. Chem. 52, 257; 1905.

Helferich (l. c.) hat die Konstanz des Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung an käuflichem Emulsin (Kahlbaum) und an seinem Präparat E II (vgl. S. 227) geprüft und gibt ausserdem den „Zeitwert“ an, also die Anzahl Minuten, welche zur Spaltung der halben Substratmenge erforderlich ist, ausgerechnet durch den Quotienten log 2 : k. Polarimetrische Beobachtung im 2 dm-Rohr unter Berücksichtigung der Mutarotation. 2%ige Salicinlösung, gepuffert mit Azetat auf pH = 4,8. Temperatur 20°.

Die Drehung des Emulsins Kahlbaum ist mit — 0,07°, die des Präparats E II mit — 0,10° berücksichtigt.

Beim käuflichen Emulsin stiegen die k-Werte etwas, bei dem viel wirksameren Präparat E II fielen sie um rund 10%. Dass bei letzterem Versuch nicht etwa eine Zerstörung des Enzyms das Fallen von k veranlasst hat, wurde durch einen besonderen Versuch festgestellt.

Polarimetrische Versuche von Henri und Lalou (Soc. Biol. 55, 868; 1903) betreffen die gleichzeitige Spaltung des Amygdalins und Salicins.

t Minuten	2% Salicin	2,5% Amygdalin	2% Salicin + 2,5% Amygdalin	4% Salicin	1,25% Amygdalin
46	0,67	0,97	1,05	1,08	0,90
130	1,58	2,38	3,63	2,25	1,57
268	2,32	3,15	4,22	3,45	1,56
∞	3,15	3,17	6,32	6,30	1,59

Die Spaltung der Mischung erfolgt viel langsamer als die der beiden Bestandteile zusammen, was vielleicht auf Verbindungen zwischen Enzym und Substrat (möglicherweise auch auf methodischen Fehlern) beruht.

Einfluss der Enzymkonzentration. Es sei zunächst wieder eine Tabelle von Tammann (l. c. S. 430) angeführt, welche drei mit Mandelemulsin angestellte Versuchsreihen enthält. Sie gibt den Spaltungsgrad, welcher in einer 3,3%igen Salicinlösung bei 28° nach 12 Stunden eintrat.

mg Emulsin		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078
Gespaltenes Salicin in %	1.	91,3	80,0	59,3	34,7	20,3	10,2	5,8	2,8
	2.	91,3	80,5	60,0	35,5	21,1	9,2	4,8	2,3
	3.	77,6	70,5	55,4	36,8	18,8	10,7	4,5	2,9

Bei kleinen Spaltungsgraden zeigt sich eine befriedigende Proportionalität zwischen den Enzymmengen und den (nach der Reduktionsmethode mit Fehlingscher Lösung) ermittelten Spaltungsprozenten; bei den über 30% hydrolysierten Lösungen ist eine Proportionalität nicht mehr zu erwarten.

Helferich zieht aus Versuchen mit Emulsin Kahlbaum und mit eigenen Präparaten den Schluss, „dass der Reaktionskoeffizient mit der Enzymkonzentration zwar steigt, aber nicht proportional, sondern langsamer als diese“. Folgende Zahlen erhielt er mit seinem wirksamsten Präparat E III:

g Emulsin auf 100 ccm Salicinlösung	Drehung 1 dm-Rohr °	Minuten	Drehung des Emulsins 1 dm-Rohr	k · 10⁴	Zeitwert	k · 10⁴ / g Emulsin/100 ccm
0,0250	— 0,25	240	— 0,005	13,5	223	540
0,0500	— 0,31	120	— 0,01	24,9	121	498
0,1000	— 0,37	60	— 0,015	45,8	65,8	458
0,200	— 0,44	30	— 0,065	88,8	33,9	444
0,4000	— 0,38	20	— 0,16	168,2	17,9	420,5

In der Figur 33 findet man diese Versuchsreihe mit den beiden anderen zusammengestellt. Man kann, wie mir scheint, aus den Kurven sowohl für Emulsin K (abgesehen vom Beginn der Kurve) als für Präparat E III eine angenäherte Proportionalität ersehen.

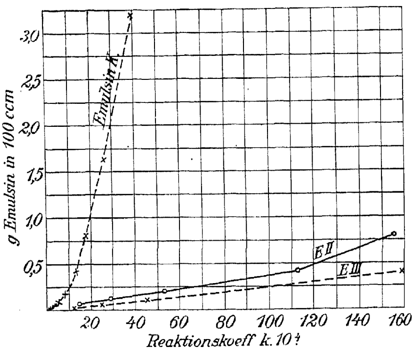


Fig. 33.

Helferich betont, „dass die Kurve sich der Geraden mehr nähert, also Enzymkonzentration und Reaktionskoeffizient einander näher proportional werden, je reiner und wirksamer die β-Glukosidase ist. Vielleicht ist dem angewandten Emulsin eine die Glukosidspaltung hemmende Verunreinigung beigemengt".

Für die grossen Mengen Enzympräparat K (bis 3 bzw. 6 g in 100 ccm) dürfte der Puffer (0,01 n-Azetat + 0,01 n-Essigsäure) zur Konstanthaltung der Azidität nicht ausgereicht haben, vielleicht auch nicht völlig für E II.

Über den Einfluss der Substratkonzentration (Salicin) hat Henri (l. c.) einige Zahlen angegeben, aus welchen hervorzugehen schien, dass der in gleichen Zeiten stattfindende prozentische Umsatz mit steigender Salicinkonzentration (0,035 norm. — 0,14 norm.) abnimmt.

Glukose bewirkt nach E. F. Armstrong[1]) eine beträchtliche Verzögerung der Emulsinwirkung auf β-Glukoside, Galaktose hemmt wenig und Fruktose gar nicht.

Über die verzögernde Wirkung der aromatischen Spaltprodukte liegen einige Versuche aus Bourquelots Laboratorium von Frl. Fichtenholz[2]) vor, welche allerdings einer Fortsetzung zur Klärung der Verhältnisse bedürfen. Hydrochinon hemmt die Hydrolyse des Arbutins stark, Tannin teilweise, Gallussäure hebt sie ganz auf. Im übrigen geht der Hemmungsgrad aus folgender Tabelle hervor:

[1]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B. 73, 516; 1904.
[2]) Fichtenholz, Jl de Pharm. et de Chim. 30, 199; 1909.

	Salicin	Gentiopikrin	Amygdalin	Koniferin	Aucubin
Hydrochinon	sehr gering	sehr gering	sehr gering	—	—
Gallussäure	mässig	mässig	mässig	mässig	fast vollständig
Tannin	mässig	mässig	mässig	mässig	mässig

Umkehrbarkeit der Glukosidspaltung. Wie bereits im I. Teil erwähnt wurde, ist es Bourquelot und seinen Mitarbeitern gelungen, eine grosse Reihe von β-Glukosiden, darunter auch viele der zyklischen Reihe, durch Emulsin zu synthetisieren. Die 1914 von Bourquelot[1]) nach Versuchen von Bridel und Hérissey angegebene Reihe sei hier nochmals angeführt:

Benzyl-Glukosid	p-Methoxybenzyl-Glukosid
Phenyläthyl-Glukosid	Naphthyl-Glukosid
Cinnamyl-Glukosid	Cyklohexanyl-Glukosid
o-Oxybenzyl-Glukosid	o-Methylcyklohexanyl-Glukosid
o-Methoxybenzyl-Glukosid	Thymotinyl-Glukosid
m-Nitrobenzyl-Glukosid.	

Die Anzahl der synthetisierten Glukoside ist später noch vermehrt worden. Auch mit mehrwertigen Alkoholen der aromatischen Reihe wurden Synthesen erzielt, so mit o- und p-Phtalylalkohol[2]).

$$C_6H_4 \begin{cases} CH_2 \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 \\ CH_2 \cdot OH \end{cases}$$

Nach den Ergebnissen von Bourquelot kann es keinem Zweifel unterliegen, dass durch die β-Glukosidasen, und zwar sowohl durch die Alkyl- als die Arryl-Glukosidasen Gleichgewichte von beiden Seiten her eingestellt werden, und dass dabei übereinstimmende Gleichgewichtslagen erreicht werden. Es steht nur noch die experimentelle Prüfung der theoretischen Forderung aus, dass dieses enzymatische Gleichgewicht mit dem durch nicht enzymatische Katalysatoren eingestellten übereinstimmt.

Tammann[3]) hat bei der Spaltung von Arbutin und Koniferin gewisse von der Menge des angewandten Enzyms abhängige Endzustände (I. Teil, S. 217) erreicht, die aber keine Gleichgewichte sind.

Die Ermittlung der „natürlichen Gleichgewichtslage" des Systems

$$\text{Arryl} \cdot \text{OH} + \text{Glukose} \rightleftarrows \text{Arryl-Glukosid} + \text{Wasser}$$

hat van't Hoff[4]) kurze Zeit vor seinem Tod in Angriff genommen. Durch dilatometrische Messungen ergab sich, dass Salicin, Arbutin und Äskulin im Gleichgewicht fast vollständig in ihre Komponenten gespalten sind.

Die Bildung von festem Salicin aus den ebenfalls festen Spaltprodukten ist von einer Ausdehnung von 9,47 ccm pro g-Mol. begleitet. Bei einem Versuch kamen 0,8 g Salicin,

[1]) Bourquelot, Jl de Pharm. et de Chim. (7), 10, 361 u. 393.
[2]) Bourquelot und Ludwig, C. r. 149, 213; 1914.
[3]) Tammann, H. 16, 271; 1892.
[4]) van't Hoff, Sitzber. Preuss. Akad. d. Wiss. 1910. 963.

0,21 g Saligenin und 0,52 g Emulsin zur Anwendung. Der Anfangszustand des Dilatometers, 208 (bei 31°) fiel nach 4 Tagen auf 104. Die Kalibrierung (100 mm = 27,8 m³) liess für 0,8 g Salicin 95 erwarten, was durch Umwandlung der in der Füllflüssigkeit vorhandenen 0,12 g Salicin sich bis zum beobachteten Wert erhöhen konnte.

Über die natürlichen Gleichgewichte aromatischer Alkylglukoside liegen noch keine Messungen vor; wir hoffen diese Lücke bald ausfüllen zu können.

Einstweilen verdient hervorgehoben zu werden, dass die aromatischen Stoffe, mit welchen Bourquelot Synthesen erzielt hat, teils primäre Alkohole vom Typus Arr. $\cdot CH_2 \cdot OH$, teils alizyklische Alkohole sind. Für den dreiwertigen aliphatischen Alkohol Glyzerin hat van't Hoff, wie bereits S. 219 erwähnt, eine Gleichgewichts-Konstante

$$K = \frac{\text{Glukosid} \times \text{Wasser}}{\text{Glukose} \times \text{Alkohol}}$$

gefunden, welche grösser als 1 ist.

Ein interessantes biologisches Glukosidgleichgewicht haben Ciamician und Ravenna 1909 an Salicin beobachtet.

Temperatur[1]).

Stabilität des Enzyms. Aus den Arbeiten von Tammann (l. c.) ergibt sich für die Temperaturen über 60° eine verhältnismässig geringe Stabilität des Enzyms (wobei allerdings unsicher ist, ob bei den Versuchen optimale Azidität geherrscht hat), noch etwas geringer als bei Saccharase; bei 60° beträgt nämlich (siehe Teil I, S. 182) $k_c \cdot 10^3 = 13$.

Für den Temperaturkoeffizienten der Stabilität (also von k_c) berechnet sich A der Arrheniusschen Formel aus Tammanns Zahlen im Bereich 60°—75° A = 45000, also ein auffallend kleiner Wert.

Nach Armstrong und Horton (Proc. 80, 325) bleibt die Aktivität gegen Salicin und Amygdalin nach mehrstündigem Erhitzen des Mandelextraktes auf 55° noch erhalten, erst Erhitzen auf 59° zerstört.

Werden Mandeln mit Wasser bei 57° extrahiert, so war die Lösung, welche bei 38° gegen β-Methylglukosid, Salicin und Amygdalin aktiv war, nach Erhitzen auf 62° (Dauer?) unwirksam.

Helferich macht über die Stabilität seines gereinigten Präparates E II folgende Angaben:

24stündiges Aufbewahren des trockenen Präparates E II unter abs. Alkohol, Azeton oder Äther beeinträchtigt die Wirksamkeit nicht. 10 Minuten Kochen mit Äthylalkohol setzt die Wirksamkeit erheblich herab.

Zeitwert vor dem Kochen: 56,1; Zeitwert nach dem Kochen: 88,7.

24stündiges Aufbewahren des trockenen Präparates E II unter Methylalkohol bei Zimmertemperatur schwächt die Wirksamkeit erheblich.

[1]) Bezüglich Berechnung siehe Rahn, Biochem. Zs 72, 353; 1916. — Tammann und Svanberg, H. 111, 49; 1920.

Kurze Einwirkung von 0,1 n. Ammoniak schwächt die Glukosidase nicht.

Temperaturkoeffizient der Glukosidspaltung. Nach den Versuchen von Tammann ist der Temperaturkoeffizient k_{t+10}/k_t zwischen 15° und 25° ziemlich hoch, nämlich 2,4; die Konstante A der Temperaturformel (29) (Teil I, S. 172 u. 193) beträgt für die Salicinspaltung 15000.

Alizarin-Glukosidase. Erythrozym.

In der Wurzel von Rubia tinctorum kommt ein Enzym vor, welches nur auf das in der gleichen Pflanze enthaltene Glukosid, Rubian oder Ruberythrinsäure wirken soll, indem es aus demselben u. a. Glukose und Alizarin bildet. Die einzige Beschreibung stammt vom Entdecker dieses Enzyms, Schunck[1]), aus dem Jahr 1851. Dieser gibt an, dass die gleiche Wirkung auch durch Emulsin hervorgerufen werden kann. Aus dem wässrigen Extrakt soll es durch Bleiacetat und Quecksilberchlorid gefällt werden.

Es ist schwer, sich aus Schuncks Angaben eine Vorstellung über die Besonderheit des erwähnten Enzyms bzw. Enzymgemisches zu bilden. Enzyme, welche Anthrachinon-Glukoside angreifen, kommen übrigens ausser in Leguminosen auch in Flechten vor, und zwar hier, wie Verf. fand, begleitet von Oxydations- und Reduktionsenzymen.

Spaltung besonderer β-Glukoside.

Ausser den Glukosiden vom Typus des Salicins kennt man noch zahlreiche natürliche Glukoside, welche — wie die Anthocyane und Saponine — grosse, besondere Gruppen von Pflanzenstoffen ausmachen.

Wenn auch über ihre enzymatische Zerlegung und Bildung noch wenig bekannt ist, so sollen sie — schon weil sie ein interessantes Material der künftigen Enzymforschung bilden — auch hier nicht ganz übergangen werden, und man findet sie also in diesem Abschnitt mit einer Anzahl von künstlich dargestellten Glukosiden zusammengestellt.

Wir erwähnen also im folgenden die in Betracht kommenden wichtigsten Gruppen der

N-freien Glukoside, und dann der

N-haltigen Glukoside.

Die Systematik muss sich wegen Mangel an Angaben über die Enzyme auch hier wieder an die Substrate halten.

An dieser Stelle muss auch an die von E. Fischer verlangte Abgrenzung des Begriffes „Glukosid" erinnert werden: „Die frühere Gewohnheit" — schreibt Fischer[2]) — „alle natürlichen Derivate der Glukose, die keine blossen Kohlehydrate sind, Glukoside zu nennen, lässt sich nicht beibehalten. Ich verstehe unter Glukosiden nur die Stoffe, welche den Methyl- oder den Phenolglukosiden ähnlich konstituiert sind."

Dass die Spaltbarkeit der Glukoside durch ein bestimmtes Enzym oder Enzympräparat schon von kleinen Konstitutions- und Konfigurationsunter-

---

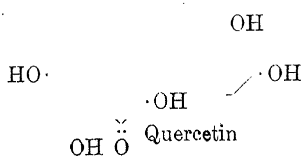
1) Schunck, Phil. Trans. 1851, 433 und 1853, 74. — Jl. prakt. Chemie 63, 222; 1854.

2) E. Fischer, Chem. Ber. 46, 3253; 1913. — Depside, S. 32.

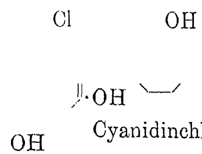
schieden stark verändert werden kann (es dürfte sich aber meistens um quantitative Änderungen handeln), ist im Anschluss an Fischer schon früher betont worden. Auch im aglukonischen Teil können Verlängerungen und Substitutionen in der Seitenkette oder am Phenylrest die Angreifbarkeit wesentlich beeinflussen. Man muss sich aber erinnern, dass dies doch keine reine Besonderheit der Enzymreaktionen ist, sondern dass grosse Variationen der Reaktionsfähigkeit auch bei der nicht enzymatisch katalytischen Spaltung von Homologen auftreten.

1. Flavonfarbstoffe und Anthocyane.

Wie durch die Untersuchungen von Willstätter[1]) bekannt geworden ist, stehen diese beiden Farbstoffgruppen miteinander in nächster Beziehung. Den gelben Farbstoffen liegt das Flavon oder Flavonol zugrunde, während die mit dem Zucker verbundenen Anteile der Anthocyane, die Anthocyanidine, Oxoniumbasen (Benzopyryliumbasen) sind, wie z. B. das Cyanidin.



Quercetin



Cyanidinchlorid

Anthocyane sind durchweg Glukoside, und zwar Mono- und Diglukoside; bei einigen kommt ausser Glukose noch Rhamnose vor, aus Idaein wird Galaktose gewonnen. Bis jetzt sind durch Willstätter und seine Mitarbeiter, besonders Everest, 8 Anthocyanidine bekannt geworden. Durch Eintritt der Hexosen an die verschiedenen HO-Gruppen leiten sich von ihnen zahlreiche Anthocyane ab.

Was die Flavonolfarbstoffe betrifft, so scheint ihre enzymatische Spaltung oft schwer durchführbar zu sein. Über Besonderheiten der diesen Glukosidgruppen entsprechenden Enzyme ist bis jetzt nichts Näheres bekannt.

2. Saponine.

Bekanntlich werden die Saponine durch verdünnte Mineralsäuren gespalten, und zwar in Produkte, welche in kaltem Wasser wenig oder gar nicht löslich und physiologisch sehr wirksam sind, Sapogenine, und in Hexosen, Pentosen oder ein Gemisch beider.

Bei wichtigen Angehörigen dieser Gruppe, wie beim Digitonin, ist die Glukosidnatur schon lange erkannt[2]). Dagegen finden sich über die enzymatische Spaltung nur vereinzelte Angaben. Viele Saponine, wie z. B. Cyklamin, widerstehen offenbar der Einwirkung des Emulsins.

Aber der Umstand, dass im Tierkörper eine Zerlegung stattfindet und ferner dass gewisse Mikroorganismen imstande sind, manche Saponine unter Verbrauch des Zuckers abzubauen, zeigt, dass Enzyme existieren müssen, durch welche sich eine Hydrolyse erzielen lässt.

---

[1]) Willstätter und Everest, Lieb. Ann. 401, 189; 1913. — Willstätter und Mitarbeiter, Lieb. Ann. 408; 1915.

[2]) Schmiedeberg, Arch. f. exp. Pathol. 3, 23; 1875. — Windaus, H. 121, 62; 1922.

3. Terpenalkohole.

Fischer und Raske[1]) haben das Borneol-β-Glukosid, Fischer und Bergmann[2]) das Menthol-β-Glukosid synthetisiert und die leichte Spaltbarkeit durch Emulsin nachgewiesen. Eine Reihe olefinischer, monocyklischer und bicyklischer Terpenalkohole sind von J. Hämäläinen[3]) mit Glukose kombiniert worden, so z. B. das Citronellol, Sabinol, Cyklohexanol und r-Borneol und auch für diese wurde die Spaltbarkeit durch eine Komponente des Mandelemulsins festgestellt. Alicyklische Reste verhindern also nicht die Wirksamkeit dieses Enzyms, das offenbar mit Phenyl-β-Glukosidase identisch ist.

Die Glukoside der Terpenalkohole treten wahrscheinlich als Zwischenprodukte im Stoffwechsel auf, wenn man die betreffenden Alkohole entweder an Tiere verfüttert oder als Arzneimittel beim Menschen verwendet. Sie sind im normalen Organismus unbeständig, indem sie zu entsprechenden gepaarten Glukuronsäuren oxydiert werden (Schmiedeberg und Meyer, Sundvik; E. Fischer). Bemerkenswert ist nach Hämäläinen die Analogie zwischen den isomeren Borneolglukosiden und den entsprechenden gepaarten Glukuronsäuren. Wenn man nämlich an Kaninchen, die vorher Emulsin subkutan bekommen haben, d- und l-Borneol verfüttert, so ist der Umfang der Glukuronsäurepaarung gesteigert.

4. Gepaarte Glukuronsäuren.

Den Nachweis, dass gepaarte Glukuronsäuren β-Glukoside sind, verdankt man Neuberg und Neimann[4]), welche die mit der natürlichen identische Phenolglukuronsäure synthetisch dargestellt haben. Neuberg hat auch ihre Konstitution und die Spaltbarkeit der Phenolglukuronsäure durch Emulsin dargetan.

$$C_6H_5O \cdot \underbrace{CH \cdot CH(OH) \cdot CH(OH) \cdot CH}_{\text{—— O ——}} \cdot CH(OH) \cdot COOH$$

Phenol-Glukuronsäure.

Indessen scheinen nicht alle gepaarten Glukuronsäuren von Emulsin angegriffen zu werden. Positive Resultate haben Neuberg und Neimann[4]) mit Euxanthonsäure erhalten, Hämäläinen[5]) mit einigen Derivaten der Terpenglukoside, z. B. l-Kamphoglukuronsäure (während die d-Form nicht gespalten werden soll), und Hildebrandt[6]) mit der von ihm aus Syringin erhaltenen Syringaglukuronsäure. Mit Borneolglukuronsäure hat Hämäläinen keine Spaltung erhalten.

---

[1]) E. Fischer und Raske, Chem. Ber. 42, 1470; 1909.

[2]) E. Fischer und Bergmann, Chem. Ber. 50, 711; 1917.

[3]) J. Hämäläinen, Biochem. Zs 49, 398; 1913 und 50, 209; 1913.

[4]) Neuberg und Neimann, H. 44, 114; 1905.

[5]) Hämäläinen, Skand. Arch. Physiol. 23, 297; 1910.

[6]) Hildebrandt, Hofm. Beitr. 7, 438; 1905. Die aus Thymotinpiperidid dargestellte gep. Glukuronsäure wird durch Hefenenzym gespalten und enthält also ein α-Glukosid.

5. Glukosidosäuren.

Die meisten bisherigen Erfahrungen über die Spaltung der Glukosidosäuren sind den Arbeiten von E. Fischer und seiner Mitarbeiter[1]) zu entnehmen, und Fischer hat gerade den Unregelmässigkeiten, welche bei dieser Gruppe hinsichtlich des Verhaltens zu Emulsin beobachtet werden, seine Aufmerksamkeit gewidmet. (Siehe auch S. 245 u. 246.)

Während manche Derivate der Phenolcarbonsäuren, z. B. Glukovanillinsäure, Glukosyringasäure, Glukosidogallussäure von Emulsin gespalten werden, sind die freien Säuren, z. B. die Glukosidoglykolsäure als widerstandsfähig gegen das Enzym erkannt (zu hohe Azidität) im Gegensatz zu ihrem Amid, das leicht hydrolysiert wird[2]). Um diese Verhältnisse aufzuklären, hat Fischer[3]) eine grosse Anzahl von Spaltungsversuchen über eine Anzahl von Glukosidosäuren und ihre Derivate angestellt, nämlich:

Glukosidoglykolsäure
Glukosido-β-oxyisobuttersäure
Glukosidomandelsäuren
Amygdalinsäure
Cellosidoglykolsäure
Glukosidosyringasäure und
Glukosidogallussäure.

Die Ergebnisse, über welche an anderen Stellen dieses Buches (siehe auch Tl. I, S. 246) berichtet ist, sind für die Beurteilung der Konstitutions- und Konfigurationseinflüsse auf Enzymreaktionen von grösstem Interesse. Weitere Einsichten in diese Verhältnisse würde man vielleicht durch die Bestimmung der Spaltungsgeschwindigkeit der verschiedenen Substrate gewinnen.

Es ist kein Anlass, zu bezweifeln, dass die Phenyl-β-Glukosidase diejenige Komponente des Emulsins ausmacht, welche auch die Glukosidosäuren spaltet.

N-haltige Glukoside.

Indikan und Isatan.

Unter den natürlichen N-haltigen Glukosiden ragt Indikan wegen seiner Beziehung zum Indigo hervor.

Dass Indigofera tinctoria ein Enzym enthält, welches zur Bildung von Indigo aus Indikan befähigt ist, hat v. Lookeren-Campagne[4]) zuerst erkannt. Eine Glukosidase als wirksames Agens neben einer Oxydase wurde in den Blättern von Isatis alpina von Bréaudat[5]) vermutet. Die Reaktion des

---

[1]) E. Fischer und Helferich, Lieb. Ann. 383, 68; 1911.

[2]) Methyl-epi-Glukosamin wird von Emulsin nicht gespalten. (Fischer, Bergmann, Schotte, Chem. Ber. 53, 509; 1920.)

[3]) E. Fischer, H. 107, 176; 1919.

[4]) v. Lookeren-Campagne, Landw. Versuchsst. 43, 401; 1894.

[5]) Bréaudat, C. r. 127, 769; 1898.

hydrolysierenden Enzyms besteht nach diesem Forscher in der Bildung von Glukose und Indigweiss, welch letzteres durch Oxydation in Indigo übergeht.

Beijerinck[1]), Hazewinkel[2]), ter Meulen[3]) und Bergtheil[4]) haben dieses Enzym näher untersucht. Auch Gaunt, Thomas und Bloxam[5]) haben ein Enzympräparat (durch Fällen mit Alkohol) dargestellt, welches aus Indikan Indoxyl abspaltet. Ein besonderes Enzym, welches nur Isatan, nicht Indikan angreift, ist nach Beijerinck in Isatis tinctoria enthalten.

Dass Indikan tatsächlich enzymatisch hydrolysiert werden kann, ist nicht zu bezweifeln. In welcher Beziehung aber die beschriebenen Enzyme zu den übrigen Glukosidasen stehen, lässt sich gegenwärtig noch nicht angeben. Isatis tinctoria und Rubia tinctoria enthalten wenig Prunasin (S. 241).

Die Indigo abspaltenden Enzyme sollen am besten in saurer Lösung wirken.

Bankankosin

aus dem Samen einer Strychnos-Art.

Dieses Glukosid ist besonders von Bourquelot und Hérissey 1908 eingehend studiert worden (C. r. 147). Es wird durch Emulsin nach folgender Gleichung zerlegt:

$$C_{16}H_{23}O_8N + H_2O = C_{10}H_{13}O_3N + C_6H_{12}O_6.$$

Puringlukoside.

Bekanntlich ist es Levene gelungen, eine Reihe von Ribosiden und neuerdings auch ein Puringlukosid aus Nukleinsäuren darzustellen[6]). Er bezeichnet diese Stoffe als Nukleoside. Dies hat E. Fischer zur synthetischen Bereitung solcher Glukoside veranlasst. Er hat mit Helferich[7]) zunächst ein Theophyllinglukosid und ein Theobrominglukosid dargestellt. Helferich[8]) hat diese Arbeiten mit der Synthese von Purin-arabinosiden und Galaktosiden fortgesetzt. Theophyllinglukosid hat Fischer durch Emulsin nicht spalten können (auch nicht durch Hefe).

Die Puringlukoside und Purinpentoside dürften in erster Linie durch tierische Enzyme angegriffen werden. Im Zusammenhang mit den Enzymen der Nukleinsäuren werden wir hierauf zurückkommen.

[1]) Beijerinck, Akad. v. Wet. Amsterdam, 1900, 572.
[2]) Hazewinkel, Akad. v. Wet. Amsterdam, 1900, 590.
[3]) ter Meulen, Rec trav. chim. Pays Bas 24, 444; 1905.
[4]) Bergtheil, Jl Chem. Soc. 85, 870; 1904.
[5]) Gaunt, Thomas und Bloxam, Jl Soc. Chem. Ind. 26, 1174; 1907.
[6]) Levene, Jl Biol. Chem. 12, 378; 1912.
[7]) E. Fischer und Helferich, Chem. Ber. 47, 210; 1914.
[8]) B. Helferich und M. v. Kühlewein, Chem. Ber. 53, 17; 1920.

7. Kapitel.

Oxynitril-β-Glukosidasen.

Wir behandeln in diesem Abschnitt diejenige Enzymgruppe, deren Substrat ein Molekül an die HO-Gruppe eines Oxynitrils — und zwar eines aromatischen oder eines aliphatischen — gebunden enthält. Die typischen Enzyme der Substrate Prunasin und Linamarin,

$$\begin{array}{c} H \\ C_6H_5 \cdot C \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 \\ CN \\ \text{Prunasin} \end{array} \qquad \begin{array}{c} CH_3 \\ CH_3 \cdot C \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 \\ CN \\ \text{Linamarin} \end{array}$$

gehören zur Hauptgruppe der β-Glukosidasen. Diese Oxynitrilglukosidasen werden aber hier zu einer eigenen Untergruppe zusammengefasst, weil die Besonderheit der Bindung an eine Gruppe $\begin{array}{c} R_2 \cdot C \cdot O \\ CN \end{array}$ — es wahrscheinlich macht und weil mehrere Tatsachen darauf hindeuten, dass hier eine Enzymgruppe vorliegt, welche mit den β-Glukosidasen vom Salikase-Typus nicht identisch ist.

A. Aromatische Oxynitril-β-Glukosidasen (Prunasen).

Substrate: Das typische Substrat ist das Glukosid Prunasin = d-Mandelsäurenitrilglukosid (E. Fischer)[1]), welches aus Amygdalin durch Abspaltung eines Moleküls Glukose mittels des Enzyms Amygdalase (vgl. S. 161) nach der Formel entsteht:

$$\begin{array}{l} C_6H_5 \cdot CH \cdot O \cdot C_6H_{10}O_4 \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 \\ \quad\;\; CN \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} C_6H_5 \cdot CH \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 \\ \quad\;\; CN \end{array} + \alpha\text{-Glukose.}$$

Ausserdem leiten sich vom Mandelsäurenitril (Benzoxynitril) noch zwei Mono-Glukoside ab, nämlich das Prulaurasin und das Sambunigrin. Prulaurasin ist die razemische Mischung von d- und l-Mandelnitril-Glukosid und entsteht sowohl aus Prunasin als aus Sambunigrin[2]) durch Razemisierung

[1]) E Fischer, Chem. Ber. 28, 1509; 1895.

[2]) Bourquelot und Hérissey, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 5 1907. — Arch. d. Pharm. 245, 463 u. 474; 1907.

mit verdünntem Alkali. Hérissey[1]) hat das Prulaurasin durch Einwirkung von Hefenextrakt (Amygdalase) auf Iso-Amygdalin erhalten. Die durch Caldwell und Courtauld sowie Bourquelot und Hérissey aufgeklärten Beziehungen der 3 Glukoside lassen sich schematisch folgendermassen darstellen:

Razem. ↓	Amygdalin	—Amygdalase→	Prunasin	(d-Mandelnitril-β-Gluk.)	↓ Razem.
durch	(dl) Isoamygdalin	——→	Prulaurasin	(dl-Mandelnitril-β-Gluk.	durch
Alkali ↑	Unbekannt	—	Sambunigrin	(l-Mandelnitril-β-Gluk.)	↑ Alkali od. Baryt[2])

Es folgen einige Daten über Vorkommen, Schmelzpunkt und Drehung der 3 Stoffe:

Glukosid	Vorkommen	Schmelzpunkt	Drehung
Prunasin	Cerasus Padus (junge Zweige)[3]) Prunus serotina (Rinde)[4])	147°—149°	— 26,85°
Prulaurasin (od. Laurocerasin)	Prunus laurocerasus (Blätter)[3]) u. Cotoneaster microphylla (Zweige)[5])	120°—122°	— 52,6°
Sambunigrin	Sambucus nigra[6]) Ribes rubrum[7])	151°—152°	— 76,3°

Es sei hier noch besonders betont, dass nach der gegenwärtigen Nomenklatur d-Mandelnitril in l-Mandelsäure verseift wird.

Über die Spaltung des Amygdalins siehe S. 242.

Ein Derivat der Prunasins ist das Dhurin aus Sorghum vulgare, welches nach Dunstan und Henry[8]) bei der Spaltung HCN und p-Oxybenzaldehyd liefert.

Über Spaltung anderer Oxynitrilglukoside, besonders von Vicianin siehe S. 251 u. 252.

Vorkommen: Im Verdauungsapparat von Kaninchen und Hunden haben Moriggia und Ossi Amygdalinspaltung in Blausäure und Benzaldehyd beobachtet. Fischer und Niebel fanden bei Wiederkäuern (Rind, Schaf) keine Spaltung, dagegen starke Hydrolyse bei Pferd und Kaninchen. Über die Verbreitung eines Prunasinspaltenden Enzyms in höheren Pflanzen liegen ausgedehnte Versuche von H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton[9]) vor. In der folgenden Tabelle sind die für die Prunasin-Spaltung gewonnenen Zahlen mit denen zusammengestellt, welche für die Spaltung des Linamarins, Amygdalins und Salicins gefunden wurden.

[1]) Hérissey, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 26, 198; 1907.
[2]) Caldwell und Courtauld, Jl Chem. Soc. 91, 671; 1907.
[3]) Hérissey, Jl de Chem. et de Pharm. 26, 194; 1907. — Arch. d. Pharm. 245, 641; 1907.
[4]) Power und Moore, Jl Chem. Soc. 95, 243; 1909.
[5]) Hérissey, Jl de Chim. et de Pharm. (6) 24, 537; 1906. — Soc. Biol. 61, 399; 1906.
[6]) Bourquelot und Danjou, Arch. d. Pharm. 245, 200; 1907.
[7]) Guignard, C. r. 141, 448; 1905.
[8]) Dunstan und Henry, Proc. Roy. Soc. B. 70, 153; 1902. — Siehe auch Schröder und Dammann, Chem. Ztg. 35, 1436; 1911. Brünnich, Jl Chem. Soc. 83, 788; 1903.
[9]) H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 85, 363; 1912.

Pflanze	HCN aus Linamarin	HCN aus Amygdalin	HCN aus Prunasin	Glukose / Salicin
Prunus laurocerasus (Okt. 1910)	1,0	1,2	61,5	39,1
„ „ (Nov. 1910)	1,2	1,5	40,7	21,0
„ „ Samen		84,4	89,2	
„ „ Samen-Hülse		1,5	9,7	
„ amygdalus (dulcis)	2,2	1,7	13,7	
„ „ (nana)	1,2	1,5	17,1	6,6
* „ „ (amara)	—	—	10,5	3,6
Laurus lusitanica	0,7	3,1	45,7	47,2
„ „ Samen		86,5	91,7	
„ „ Samen-Hülse		10,7	19,5	
Aucuba japonica	0,5	2,5	79,5	67,6
„ „ Samen	—	3,0	76,0	56,7
„ longifolium	0,5	3,2	76,5	48,7
Garrya elliptica	0,5	1,2	32,7	29,8
„ thuretii	0,7	0,7	13,2	
Laurustinus	0,5	0,5	1,2	
Skimmia japonica, Samen	—	—	2,2	
*Salix rubra (1910)	0,7	3,8	16,5	27,3
„ „ (1911)	—	—	—	45,7
Epilobium angustifolium (1910)	1,5	2,3	16,5	9,6
„ „ (1910)	0,7	0,7	4,1	4,8
Epilobium angustifolium				
*Schweiz, Saas Tal (1910)			5,7	29,1
Aryshire (1911)				4,5
Norwegen: Myrdal (1911)				34,7
Norwegen: Voss-Bergen (1911)				14,5
Norwegen: Fjaerland (1911)				17,1
Epilobium hirsutum (Thames) (1911)				3,2
Gaultheria shallon	0,5	0,7	1,6	0,7
„ procumbens			26,0	10,0
„ „ Samen			27,5	7,0
Arbutus unedo	0,5	0,7	4,2	1,8
Calluna vulgaris			3,0	—
*Arctostaphylos uva-ursi			1,0	6,0
*Vaccinium Myrtillus			29,0	1,0
„ uliginosum			—	—
*Castanea sativa, Frühjahr 1910	1,5	6,2	65,5	55,8
„ „ Herbst 1911	—	—	—	
Vicia sativa	1,2	1,6	11,5	
„ cracca	8,0	7,8	24,7	15,8
„ sepium	3,2	4,5	36,9	31,8
„ sylvatica	1,8	2,5	11,1	
„ villosa	2,5	2,5	10,0	
Lathyrus pratensis	2,0	1,5	5,6	
„ aphaca	1,2	0,7	2,3	
Ononis arvensis	—	—	28,0	
Medicago sativa	6,7	3,2	14,5	
Onobrychis sativa	2,5	2,0	7,5	
Trifolium pratense	2,5	2,5	8,2	

*) Diese Blätter wurden vor dem Trocknen vollkommen gewaschen.

Pflanze	HCN aus			Glukose
	Linamarin	Amygdalin	Prunasin	Salicin
Galega officinalis	—	—	3,0	—
Lythrum salicaria	—	—	15,7	—
Spiræa ulmaria	—	—	4,0	—
Lotus corniculatus	64,5	2,7	32,0	27,8
„ uliginosus (major)	1,8	1,5	2,0	—
„ jacobæus	86,0	—	—	—
Aquilegia vulgaris	1,5	—	—	—
Thalictrum aquilegifolium	0,7	—	—	—
Asperula odorata	—	—	4,2	—
Galium verum	—	—	8,6	3,2
Isatis tinctoria	—	—	2,7	—
Rubia tinctoria	—	—	1,7	—

Die Zahlen sind in der Weise gewonnen, dass 1 g getrocknetes und gemahlenes Pulver der betreffenden Blätter zu 100 ccm 0,2 normaler Lösungen der betreffenden Glukoside gegeben wurden. Nach 24-stündiger Reaktion bei 37° wurde die prozentische Spaltung festgestellt, und zwar wurde bei den 3 ersten Glukosiden die Blausäure bestimmt, beim Salicin die Glukose.

Inwieweit diese Zahlen einer Korrektion bedürfen wegen der Abweichungen der Reaktionslösungen von der optimalen Azidität lässt sich natürlich schwer beurteilen.

Malzextrakt spaltet nach Marc van Laer[1]) Amygdalin, nicht Salicin (225).

Aziditätsbedingungen: Willstätter und Csányi (l. c.) teilen mit, dass das Aziditätsoptimum der Prunase-Wirkung bei etwa pH = 4,4 liegt und somit einen etwas anderen Wert hat, als das mit Amygdalin als Substrat gefundene (rund pH = 6). Wie aus der Fig. 34 ersichtlich ist, macht dieser Aziditätsunterschied bei der Amygdalinspaltung etwa 100 % aus. Sowohl Oberhefe [Henry und Auld[2])] als Unterhefe [Neuberg[3])] können vollständige Amygdalinspaltung bewirken.

Willstätter und Csányi verdankt man auch die folgenden Zahlenangaben über die Wirksamkeit von Mandeln und Emulsinpräparaten gegenüber verschiedenen Substraten.

Verschiedene Mandeln.

Zeitwert für Spaltung von	Bittere Mandeln		Süsse Mandeln	Aprikosenkerne
	Ältere Probe (5 Monate)	Frische Probe		
Prunasin				770
Amygdalin	528	500	1 240	1200, 1250
β-Methylglukosid	345 000	339 000	332 000	—
Laktose	—	860 000	—	442 000
Raffinose	645 000	610 000	423 000	308 000

[1]) Marc van Laer, Soc. Biol. 84, 471; 1921. (Vermutlich Amygdalasewirkung.) Siehe auch Maestrini, A. R. acad. Lincei 29, 164; 1920.

[2]) Henry und Auld, Proc. Roy. Soc. B. 76, 568; 1905.

[3]) Neuberg und Färber, Bioch. Zs 78, 264; 1917.

Zeitwert für Spaltung von	Präparat 1 Zeitwert für Amygdalin frisch 10; 6 Mon. alt	Präparat 2 Zeitwert für Amygdalin frisch 18; 5 Mon. alt	Präparat 3 Zeitwert für Amygdalin frisch 41; 7 Mon. alt	Handelspräparat
Prunasin . . .	11	39	56	130
Amygdalin . . .	18	54	93	140
β-Methylglukosid	12 200	10 800	22 600	90 000
Laktose	26 400	75 000	111 050	486 000
Raffinose . . .	140 000		142 000	170 000

Wählt man die Prunasinspaltung als Einheit, so berechnen sich aus letzterer Tabelle folgende (abgerundete) relative Zahlen.

Relativer Zeitwert für Spaltung von	Präparat 1	Präparat 2	Präparat 3	Handelspräparat
Prunasin . . .	1	1	1	1
Amygdalin . . .	1,6	1,4	1,65	1,08
β-Methylglukosid	1 110	277	4 000	7 000
Laktose	2 400	1 924	20 000	37 000
Raffinose . . .	12 730		25 000	13 100

B. Amygdalin-Spaltung.

Substrat: Das für die Untersuchung des Emulsins am häufigsten benutzte Glukosid, das Amygdalin, ist bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel (S. 239) sowie bei der Besprechung der Amygdalase erwähnt worden; auf S. 161 findet man seine Konstitutionsformel nach Auld angegeben.

Amygdalin kristallisiert aus Wasser mit 3 Mol. H_2O. Die Kristalle geben über Schwefelsäure 1 Mol. H_2O ab, werden bei 110°—120° wasserfrei und schmelzten dann bei 205°; die erstarrte Masse schmilzt bei 125°—130°. $[\alpha]_D = -41,6^0$ (Auld). Löslich in 12 Teilen Wasser, ziemlich löslich in Alkohol, unlöslich in Äther.

Die Hydrolyse des Amygdalins durch Säuren ist von Caldwell und Courtauld[1]) Walker[2]) und V. K. Krieble[3]) untersucht worden. Konz. HCl hydrolysiert zunächst die CN-Gruppe unter Bildung von Amygdalinsäure, dann entsteht l-Mandelsäureglukosid[2]); durch verdünnte Salzsäure entsteht Mandelsäurenitrilglukosid[1]). Durch Säuren wird nämlich die Bindung zwischen den beiden Glukoseresten relativ leicht hydrolysiert. Die Spaltung des Benzoxynitrils soll durch 1 n H_2SO_4 weniger beschleunigt werden als durch HCl in entsprechender Konzentration[3]). (? Vgl. hierzu die Untersuchung von Nordefeldt, Biochem. Zs. 131, 390; 1922.)

[1]) Caldwell und Courtauld, Jl Chem. Soc. 91, 666; 1907.
[2]) J. Wallace Walker, Jl Chem. Soc. 83, 472; 1903.
[3]) J. Wallace Walker und Vernon K. Krieble, Jl Chem. Soc. 95, 1369; 1909.

Nach Emmerling[1]) soll es gelingen, das natürliche Amygdalin vermittels Hefenextrakt aus Mandelsäurenitrilglukosid und Glukose zu synthetisieren.

Da, wie schon S. 163 erwähnt, an der Spaltung des Amygdalins mehrere Enzyme beteiligt sein müssen, so ist der Verlauf der Gesamtreaktion

Amygdalin ⟶ Benzaldehyd + Blausäure + 2 Mol. Glukose

kein einfacher und die Beurteilung der Geschwindigkeit an der Bildung einer einzigen Komponente ist nicht eindeutig. Von einem spezifischen Enzym der Amygdalinspaltung kann also nicht gesprochen werden.

Bezüglich des Vorkommens der beteiligten Enzyme muss auf das S. 211 Gesagte verwiesen werden. Wird Amygdalin als Substrat verwendet, so muss jedenfalls immer ausdrücklich erwähnt werden, welche Reaktion studiert, bzw. welches Spaltprodukt bestimmt wurde.

Aziditätsbedingungen: Die Abspaltung von Glukose aus Amygdalin ist hinsichtlich des Aziditätsoptimums von Willstätter und Csányi neuerdings genau untersucht worden.

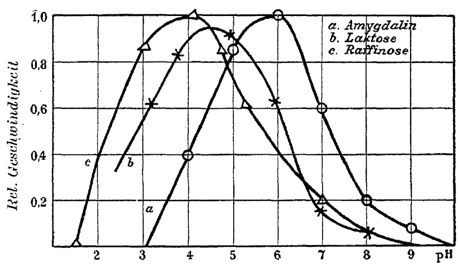


Fig. 34.

Die Abhängigkeit dieser Amygdalinspaltung von pH in der Nähe des Optimums ermittelten Willstätter und Csányi mit 1 mg Emulsin vom Zeitwert 31 bei 1-stündiger Einwirkung auf 0,1 g Amygdalin.

Puffer	pH	% Spaltung in 60 Minuten
5 Na Ac + 4 Essigsäure	5,0	62,3
0,4 sek. + 9,6 prim. Phosphat	5,5	63,1
1,2 „ + 8,8 „ „	6,0	72,5
2,0 „ + 8,0 „ „	6,25	66,25
3,0 „ + 7,0 „ „	6,5	65,0

Fig. 34 enthält ihre für verschiedene Substrate erhaltenen Resultate. Aus Kurve a geht hervor, dass das Optimum für Amygdalin bei pH = 6 liegt. Diese Zahl ist nicht sehr verschieden von der früher von Vulquin[2]) (ebenfalls mit der Sörensenschen Methodik) gewonnenen, pH = 5,5 — 5,7.

[1]) Emmerling, Chem. Ber. 34, 3810; 1901.
[2]) Vulquin, Soc. Biol. 70, 270 u. 763; 1911.

Auld fand Neutralität (pH = 7) am günstigsten: Die frühere Angabe von Bertrand und Compton[1]), das Optimum der Amygdalinspaltung trete bei schwacher Alkalinität ein, wurde von diesen Autoren später dahin ergänzt, dass beim Altern des Emulsins das Optimum zur sauren Seite übergeht[2]); dieses Ergebnis versuchen Willstätter und Csányi (l. c. S. 180) darauf zurückzuführen, dass in Bertrands Emulsin mit zunehmendem Alter vorwiegend die Amygdalase zerstört worden ist.

Neutralsalzwirkung. Kleinere Mengen Neutralsalz scheinen keinen nennenswerten Einfluss zu besitzen. Willstätter hat mit Phosphat- und Acetatpuffern gleicher Azidität übereinstimmende Wirkung gefunden.

Kinetik. Die ersten kinetischen Versuche über Amygdalinspaltung verdankt man Tammann[3]).

Amygdalinmenge	2,555	5,11	10,22
t Min. = 14	0,61	0,61	0,50
19	0,77	0,85	0,73
23	0,79	0,98	0,86

Auld[4]) hat bei seinen ausgedehnten Studien über Amygdalinspaltung die Reaktion zunächst in der Weise verfolgt, dass er die freigewordene Cyanwasserstoffsäure jodometrisch bestimmte. Im 2. Teil seiner Arbeit (S. 1279) hat er besprochen, unter welchen Umständen die Bildung von freier Blausäure und von freier Glukose parallel verlaufen müssen.

„Falls Mandelnitrilglukosid als Zwischenprodukt der Reaktion gebildet und langsamer hydrolysiert wird als Amygdalin (was der Fall zu sein scheint), dann sollen Bestimmungen der freien Blausäure und des gebildeten Benzaldehyd relativ niedrigere Spaltungszahlen ergeben als die Bestimmungen der Glukose."

„Sollte ferner das Emulsin, nachdem es sich an das β-Glukosid angelagert hat, was es offenbar als β-Enzym tun muss, die intermediäre Bildung eines αβ-Disaccharides veranlassen, so müssten die aus den Glukosebestimmungen gewonnenen Werte unter diejenigen fallen, welche sich aus der Messung von Blausäure und Benzaldehyd herleiten; nur im Fall, dass das Enzym die Biose-Bindung und die Cyanhydrinbindung gleichzeitig aufhebt, werden Blausäure, Benzaldehyd und Glukose stets in solchen Mengen gebildet werden, welche der Gesamtformel der Amygdalinspaltung entsprechen."

Auld gibt an, dass durch die untersuchten Emulsine das Disaccharid (die Amygdalase) nicht als Zwischenprodukt gebildet wird, und dass also durch Bestimmung von HCN und Benzaldehyd immer niedrigere Spaltungswerte erhalten werden als durch Bestimmung der Glukose. Er gibt folgende Tabelle:

[1]) Bertrand und Compton, C. r. 153, 360; 1911.
[2]) Bertrand und Compton, Bull. Soc. Chim. France (4) 29, 229; 1921.
[3]) Tammann, Zs f. physik. Chem. 3, 33; 1889 u. 18. — H. 16, 271; 1892.
[4]) Auld, H. Chem. Soc. 93, 1251; 1908.

Stunden	Angewandt g		Entstanden mg		% Spaltungsgrad berechnet aus		
	Amygdalin	Emulsin	HCN	Cu_2O kor.	HCN	Glukose[1])	Benzaldehyd[1])
0,5	0,4	0,03	5,56	609	23,5	27,8	—
1,0	0,4	0,03	10,00	1052,0	42,5	48,0	—
1,25	0,4	0,03	11,87	1280,0	50,2	58,4	49,9
2,25	0,4	0,03	17,72	1861,0	75,0	85,1	75,8
16,0	1,2	0,10	65,01	—	91,7	—	91,0
20,0	1,5	0,20	76,65	2080,0	93,4	94,9	94,0
4,0	0,3	0,06	14,30	1990,0	87,0	90,8	—
1,75	0,3	0.06	13,30	1930,0	81,5	88,1	—
0,25	0,3	0,04	4,69	—	28,4	—	28,6
24,0	1,5	0,30	79,69	2135,8	97,0	97,5	96,5

Auld zieht aus seinen Resultaten den Schluss, dass die Reaktion in zwei Stufen verläuft und dass die Biosebindung im Amygdalin gegen Emulsin weniger resistent ist als die Bindung des Benzaldehydcyanhydrins.

Da es nunmehr kaum zweifelhaft ist, dass 3 Komponenten des Emulsins an der Amygdalinspaltung beteiligt sind, so muss die relative Menge der gebildeten Glukose und der Blausäure je nach der Zusammensetzung des Enzympräparates wechseln.

Was den zeitlichen Verlauf der Blausäureabspaltung betrifft, so kann folgende Tabelle Aulds (S. 1269) als Beispiel dienen:

300 ccm 2%ige Amygdalinlösung + 15 ccm 2%ige Emulsinlösung

Minuten	x	$k \cdot 10^5$
10	6,1	255
80	45,2	295
100	54,9	309
150	75,3	347
1360	93,2	

Die natürlich vorkommenden Nitrile der Glukosidomandelsäure (Mandelnitrilglukosid und Sambunigrin) werden, wie bekannt, beide leicht von dem Emulsin angegriffen. Die Asymmetrie des einen Kohlenstoffatoms in dem Mandelnitrilrest ist also, wie E. Fischer (H. 107) erwähnt, für die Wirkung des Enzyms ohne Bedeutung. Bekanntlich werden aber diese beiden Nitrile leicht ineinander verwandelt, und Fischer weist auf die Möglichkeit der Bildung einer tautomeren Form

$$C_6H_{11}O_5 \cdot O \cdot \underset{C_6H_5}{C} = NH$$

bei der Wirkung des Emulsins hin (Chem. Ber. 50, 1050).

„Komplizierter liegen die Verhältnisse bei der Amygdalinsäure und ihren Derivaten; denn sie leiten sich ab von einem Disaccharid, das selbst von Emulsin angegriffen und in Traubenzucker verwandelt wird. Hier hat man

[1]) Benzaldehyd bestimmt nach der Methode von Ripper, Glukose gravimetrisch.

also zu unterscheiden zwischen der Abspaltung von einem Molekül Traubenzucker aus dem Disaccharid und der Loslösung des zweiten Moleküls Traubenzucker aus der Glukosidgruppe. Infolgedessen ist zu erwarten, dass bei den Salzen der d-Amygdalinsäure höchstens die Hälfte der theoretisch möglichen Menge Traubenzucker entstehen kann, was mit den Beobachtungen übereinstimmt. Bei den Derivaten der l-Amygdalinsäure ist dagegen eine vollständige Loslösung des Zuckers unter günstigen Bedingungen zu erwarten. Leider kennt man diese l-Säure noch nicht in reinem Zustand. Aber die Beobachtungen bei dem Gemisch von d- und l-Säure machen jenen Schluss recht wahrscheinlich.

Bei Ester und Nitril ist auch für die Derivate der Mandelsäure völlige Abspaltung des Zuckers als d-Glukose kaum zu bezweifeln."

Mit „Phaseolunatase" aus Phaseolus lunatus beobachtete Auld folgenden Reaktionsverlauf:

10 ccm 1%ige Amygdalinlösung + 30 ccm 2%ige Enzymlösung. Temp. 40°.

Minuten	mg HCN gebildet	% Amygdalin gespalten
60	2,04	34,5
120	2,52	42,7
180	3,01	50,9
240	3,40	57,6

Polarimetrische Versuche über die Amygdalinspaltung von Henri und Lalou[1]) sind bereits S. 229 erwähnt.

Bezüglich der Bildung von Blausäure und Glukose kamen H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton[2]) zu ähnlichen Resultaten wie Auld. Die ersteren Forscher geben folgende Zahlen an (Versuchsbedingen nicht näher bezeichnet):

Stunden	Prozentische Spaltung, gemessen durch		
	Drehung	HCN	Glukose
1	14,6°	9,9	16,7
3	33,0	26,7	35,5
5	44,7	38,6	46,1
7	53,7	48,5	56,7
9	59,9	56,9	63,9
11	65,5	63,3	69,0
25	76,8	80,7	79,1

Die Fig. 35 macht die mittels der 3 analytischen Methoden erhaltenen Divergenzen noch anschaulicher. Die englischen Autoren haben eine Berechnung der obigen Zahlen, die sich auf eine zusammengesetzte Reaktion beziehen, nach der für monomolekulare Reaktionen geltenden Formel nicht für lohnend gehalten.

[1]) Henri und Lalou, Soc. Biol. 55, 868; 1903.

[2]) H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 80, 321;

Schliesslich sei eine Versuchsreihe von Willstätter und Csányi angeführt, welche die gebildete Glukose nach Sonntag-Bertrand bestimmten.

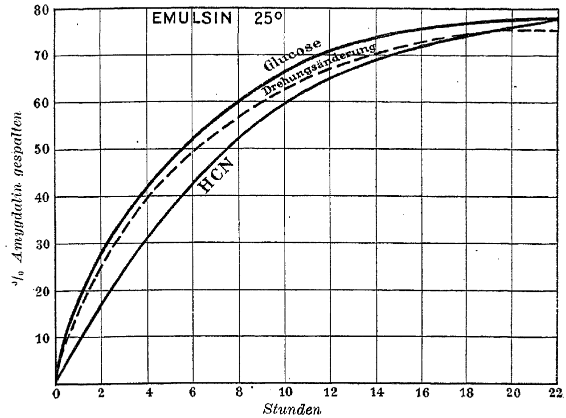


Fig. 35.

1 %ige Amygdalinlösung; 2,5 mg Emulsin; pH = 6; Temp. 30°.

Minuten	% Spaltung	$\frac{10^4}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
12	6,68	57,5
24	10,95	48,3
40	14,50	49,2
60	22,03	41,4
90	31,84	42,5
120	39,24	41,5
180	51,75	40,4
1200	96,00	(25,7)

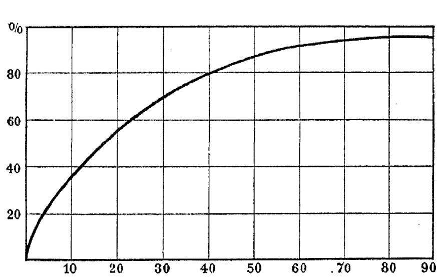


Fig. 36.

Die Figur 36 ist der gleichen Arbeit entnommen.

Einfluss der Amygdalinkonzentration. Auld verwendete zu jedem Versuch 1 ccm Emulsinlösung (2 %) in 50 ccm. Temp. 39,5°.

Minuten	Angewandt g Amygdalin	Gebildet mg HCN	Gespalten % Amygdalin
20	0,1	2,74	46,4
20	0,2	2,74	23,2
20	0,3	2,60	14,7
20	0,4	2,60	11,0
20	0,6	2,53	7,2
25	0,8	3,48	7,4
25	1,0	3,48	5,9
25	1,25	3,40	4,6
25	1,5	3,32	3,7

Bei dieser Versuchsreihe sind also die gebildeten Mengen HCN nur wenig abhängig von der anfänglichen Substratkonzentration. Dieser Befund gilt natürlich nur für gewisse Enzymkonzentrationen; er ist typisch für die Fälle, bei welchen das Substrat im Überschuss über das Enzym vorhanden ist.

Arbeitet man mit verdünnten Amygdalinlösungen, so wird die Konstante von der Konzentration des Amygdalins unabhängig, wie es die Theorie verlangt (Auld, l. c. S. 1270). Totalvolumen: 20 ccm, 3 ccm 2%iger Emulsinlösung.

Minuten	Angewandt g Amygdalin	Gebildet mg HCN	Gespalten % Amygdalin	0,4343 k · 10^4 1/t log a/a — x
10	0,05	1,38	0,0252	304
10	0,03	0,85	0,0155	315
10	0,02	0,53	0,0097	297

Einfluss der Enzymkonzentration. Die folgenden Zahlen von Auld (l. c. 1268) beziehen sich auf eine Versuchsreihe, bei welcher 50 ccm einer 2%igen Amygdalinlösung mit einer steigenden Anzahl ccm einer 2%igen Emulsinlösung gemischt wurden.

Enzymmenge	2	3		6	12	25	50 ccm
Nach 10 Minuten hydrolysiert in %	3,6	6,0	8,9	12,5	17,1	21,6	24,1

Willstätter und Csányi fanden:

Versuchs-Nr.	mg Emulsin	Minuten	% Spaltung
1	0,5	60	40,10
	1,0	30	40,37
	0,5	120	62,27
	1,0	60	60,70
	5,0	12	62,27

Das Produkt Zeit × Enzymmenge zeigt also eine sehr befriedigende Konstanz.

Der Einfluss der Spaltprodukte ist von Auld recht eingehend studiert worden. Die charakteristischen Ergebnisse seien hier mitgeteilt:

20 ccm 2%ige Amygdalinlösung + 1 ccm 2%ige Emulsinlösung.
Reaktionszeit 30 Minuten. Temp. 40°.

Zugesetzte Glukose		Gebild. HCN	Gesp. Amygdalin
g	mg-Mol.	mg	%
0	0	3,2	13,5
0,2	1,1	3,1	13,3
0,4	2,2	3,0	12,6
0,75	4,2	2,8	11,8
1,0	5,5	2,7	11,6

Etwas stärkere Verzögerungen wurden durch Benzaldehyd hervorgerufen.

Gesättigte Benzaldehydlösung + 20 ccm 2%ige Amygdalinlösung + 2 ccm 2%ige Emulsinlösung. Vol. 50 ccm. — Reaktionszeit 30 Min. — Temp. 40,5°.

Zugesetzt Benzaldehyd mg-Mol.	Gebild. HCN mg	Gesp. Amygdalin %
0	6,1	26,0
0,031	6,0	25,8
0,157	5,45	23,1
0,314	5,1	21,7
0,471	4,7	20,0

Schliesslich ergaben die Zusätze der gemischten Reaktionsprodukte der Grössenordnung nach dem obigen entsprechende Resultate.

Spaltungsgrenze.

Wie Tammann so hat auch Auld keine vollständigen Spaltungen in verdünnten Amygdalinlösungen erzielt. Er gibt für eine bei 40° angestellte Versuchsreihe folgende Tabelle an:

Stunden	Angewandt		Abgespalten %	
	ccm 2%ig. Emulsinlösung	ccm 2%ig. Amygdalinlösung	HCN	Benzaldehyd
20	10	75	93,4	94,0
24	15	75	97,0	96,5
16	3	15	91,7	91,0

Hemmungsstoffe. Nach Hébert[1]) sollen Zirkonium- und Thoriumsulfat schon in kleinen Konzentrationen schädigen, nicht dagegen Cer- und Lanthansulfat (Aziditätsbeeinflussung?).

[1]) Hébert, Bull. Soc. Chim. 35, 1209; 1906.

Die gebräuchlichen anästhetischen Mittel Toluol, Chloroform, Äther, auch Thymol sind ohne Wirkung. Dagegen wird Formaldehyd als Paralysator angegeben.

Zerstörung durch andere Enzyme. Eine ältere Angabe von Claude Bernard, dass Magensaft das Amygdalin-spaltende Enzym zerstört, ist wohl auf die hohe Azidität dieser Flüssigkeit zurückzuführen[1]).

Einfluss der Temperatur und der Strahlung auf die Spaltungsgeschwindigkeit.

Die folgenden Versuchszahlen sind ebenfalls der Arbeit von Auld entnommen. Ich habe die angegebenen k-Werte graphisch interpoliert und daraus die Koeffizienten A der Temperaturformel (29) I. Teil, S. 172, berechnet.

Temperatur	gef.	$k \cdot 10^4$ (interpoliert)	A (interpoliert)
15	139	—	—
20	263	245	—
25	330	350	11 900
30	478	478	10 800
35	707	625	10 400
40	807	807	10 150
45	970	1060	9 900
50	1384	1330	—
55	1015	—	—
60	914	—	—

A bei 25° etwa = 11000. Wie bei den meisten enzymatischen Reaktionen nimmt A mit steigender Temperatur ab.

Strahlung.

Einige Angaben über die Wirkung des Sonnenlichtes findet man bei Marino, (Arch. de Fisiol. 8, 40; 1910); durch ultraviolettes Licht tritt nach dem Befund non Giaja[2]) Inaktivierung ein.

Bildung und Variation der Amygdalin-spaltenden Enzyme in Pflanzen.

Hérissey teilt in seiner mehrfach erwähnten Dissertation 1899 die interessante Beobachtung mit, dass sich in Samen von Cerasus avium Emulsin zeitiger bildet als Amygdalin.

Man findet in der bereits zitierten Mitteilung von Armstrong und Eyre einige Angaben, welche den Wechsel der Aktivität und der Mengen der Enzyme mit der Jahreszeit betreffen.

Siehe ferner Guignard, Jl de Pharm. et de Chem. (5) 21, 233; 1890.

[1]) Siehe hierzu Frouin und Thomas, Soc. Biol. 60, 1039; 1906.

[2]) Giaja, Soc. Biol. 72, 2; 1912.

C. Spaltung anderer Nitril-β-Glukoside.

Spaltung des Linamarins. Ein HCN-abspaltendes Enzym wurde von Jorissen und Hairs[1]) mit Linamarin im unreifen Samen von Linum usitatissimum entdeckt. Dunstan, Henry und Auld[2]), die es in Phaseolus lunatus fanden und studierten, änderten den Namen Linase in Phaseolunatase um. Weitere Angaben über die Verbreitung und Eigenschaften des Enzyms findet man bei Auld sowie bei H. E. Armstrong und Eyre[3]) wie auch bei Armstrong und Horton (Proc. 82, 349). Siehe auch die Tab. S. 240.

Substrat. Durch die S. 238 angegebene Formel des Linamarins ist dieses Substrat bereits als ein Acetonoxynitril-Glukosid charakterisiert. Die Synthese des Linamarins ist von E. Fischer und Anger[4]) durchgeführt worden, und zwar aus Aceto-bromglukose und Oxy-isobuttersäure-äthylester; über Glukosido α-oxy-isobutyramid entstand Tetraacetyl-linamarin und daraus durch NH_3 Linamarin. Das synthetische Glukosid schmolz bei 142—143° (korr.); Dunstan und Henry hatten für das natürliche Glukosid 141° gemessen.

In 3%iger wässriger Lösung war $[\alpha]_D^{18} = -29{,}1^0$ für das synthetische Glukosid, während für das natürliche niedrigere Drehungen, 27,4° bis 27,2° (de Jong) angegeben waren.

Dieses Glukosid ist aber für die Glukosidase des Leins keineswegs spezifisch, dann auch Prunasin, Salicin und β-Metylglukosid werden von Enzympräparaten aus Linum-Arten zerlegt.

Die Annahme einer besonderen „Linase" war darin begründet, dass Amygdalin von Leinenzymen gar nicht angegriffen wird. Dies besagt aber zunächst nur, dass im Lein eine Amygdalase fehlt. Es ist dann allerdings noch zu bemerken, dass durch Leinenzym die unveränderte Amygdalose nicht abgespalten wird. Das Phaseolus-Enzym greift aber sowohl Prunasin als Linamarin an, während Prunase gegen Linamarin wirkungslos ist.

H. E. Armstrong[5]) deutet die gefundenen Tatsachen so (Proc. 85, 372), dass Linase nicht so spezifisch wirkt wie Prunase. „The smaller key can be passed into both locks, but the larger will not fit into that, to wich the smaller key properly belongs."

Ob also die Fähigkeit des Leinenzympräparates, das Substrat

$$(CH_3)_2 \cdot C \begin{matrix} \diagup OH \\ \diagdown CN \end{matrix}$$

in Aceton und HCN zu zerlegen, auf eine „Acetcyanase" zurückzuführen ist, bleibt noch unentschieden.

---

[1]) Jorissen und Hairs, Bull. Acad. R. Belg. (3) 21, 529; 1891.

[2]) Dunstan, Henry und Auld, Proc. Roy. Soc. B. 78, 145; 1906 und 79, 315; 1907. — Siehe auch Dunstan und Henry, ebenda 72, 285; 1903.

[3]) H. E. Armstrong und Eyre, Proc. Roy. Soc. B. 85, 370; 1912.

[4]) E. Fischer und Gerda Anger, Chem. Ber. 52, 854; 1919.

[5]) H. E. Armstrong und Eyre, Proc. Roy. Soc. B. 85, 370; 1912.

Ähnliche Enzymkomplexe sind weiter von H. E. Armstrong[1]) in Lotus corniculatus (verschiedener Standorte) und von van Romburgh[2]) in Hevea brasiliensis und Manihot utilissima gefunden worden.

Spaltung des Vicianins. Wie G. Bertrand[3]) gefunden hat wird Vicianin, das in Vicia angustifolia und Vicia macrocarpa vorkommt, enzymatisch in Vicianose (eine Gluko-Arabinose), HCN und Benzaldehyd gespalten. (Vicianin unterscheidet sich vom Amygdalin also nur durch die zweite Zuckerkomponente.) Das Enzym Vicianinase, welches diese Fähigkeit besitzt, haben Bertrand und Rivkind in den meisten Leguminosensamen gefunden. Ob es von der Prunase verschieden ist steht noch nicht ganz fest. Siehe auch H. E. und E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 85, S. 360. In den beiden genannten Vicia-Arten wird das HCN und Phenylglykol abspaltende Enzym nicht von einem weiteren Enzym begleitet, welches die Vicianose zerlegt. Ein Enzym, welches Vicianose in Glukose und Arabinose hydrolisiert, haben Bertrand und Weissweiller[4]) in Helix Pomatia (?) gefunden. Vielleicht gehört es, wie Amygdalase, der α-Reihe an.

Anhang.

Spaltung des Glykolnitrilcellosids. Dieses Glukosid wurde von E. Fischer und Anger[5]) aus Azeto-bromcellose synthetisch erhalten und auf sein Verhalten gegen Emulsin geprüft. Mit käuflichem Emulsin wurde bei 37° in 24 Stunden 92—96 % der theoretischen Menge Traubenzucker gewonnen.

Spaltung des Gynokardins. Aus diesem Glukosid, das unter anderem in den Samen von Gynocardia odorata vorkommt, lässt sich 1 Mol. Glukose, HCN und eine Verbindung gewinnen, welche vermutlich ein Trioxyaldehyd oder Keton ist[6]). Der Unterschied des in Gynacardia wirksamen Enzyms, Gynokardase, gegen Phaseolunatase dürfte gering sein.

Zur Frage, ob ein besonderes Enzym vorliegt, siehe Moore und Tutin (Trans. Chem. Soc. 97; 1910). Ein Enzym in Pangium edule beschreibt de Jong (Rec. trav. chim. Pays-Bas 30; 1911).

Spaltung des Lotusins. Dunstan und Henry[7]) haben aus Lotus arabicus das Glukosid Lotusin isoliert. Es enthält das Flavonderivat Lotoflavin (1, 3, 3′ 5′-Tetraoxyflavon) und einen Maltosecyanhydrinrest. Es soll sich vom Amygdalin dadurch unterscheiden, dass die CN-Gruppe an den Zucker gebunden ist. Wenn sich dies bestätigt, wäre das betreffende Enzym, die „Lotase“, nicht hier der Prunase anzureihen, sondern den Flavonolglukosidasen (S. 234).

[1]) H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 84; 471; 1912.

[2]) van Romburgh, Ann. Jardin Buitenzorg 16, 1; 1899.

[3]) Bertrand, C. r. 143, 832; 1906. — Bertrand und Rivkind, C. r. 143, 970; 1906. — Bertrand und Weissweiler, C. r. 147, 252; 1908 und 150, 180; 1910.

[4]) Bertrand und Weissweiller, C. r. 151, 325; 1910.

[5]) E. Fischer und Gerda Anger, Chem. Ber. 52, 854; 1919.

[6]) Power und Lees, Proc. Chem. Soc. 21, 88; 1905. — Jl Chem. Soc. 87, 349; 1905.

[7]) Dunstan und Henry, Proc. Roy. Soc. B. 67, 224; 1901 u. 68, 374; 1901.

Zur Kenntnis der HCN-liefernden Pflanzen sei auf die eingehende Übersicht von Greshoff[1]) verwiesen.

Weitere Literatur über enzymatische Spaltung von Nitril-Glukosiden:

Heut, Arch. d. Pharm. 239, 582; 1901.

van Italie, Arch. d. Pharm. 243, 553; 1905 und 248, 251; 1910.

Bourquelot, C. r. 117, 383; 1893. — Bourquelot und Hérissey, Bull. Soc. Myc. France 10, 49; 1899 und 11, 19; 1895. — C. r. 121, 693; 1895.

Puriewitsch, Bot. Ber. 16, 368; 1898.

D. Vorgänge und Gleichgewichte im System Benzaldehyd, Cyanwasserstoffsäure, Wasser und Oxynitril.

Obwohl es sich durch die Arbeiten der letzten Jahre gezeigt hat, dass sich das Gleichgewicht

$$C_6H_5 \cdot CHO + HCN \qquad \text{rac. } C_6H_5 \cdot CH \begin{matrix} \diagup OH \\ \diagdown CN \end{matrix}$$

ohne Mitwirkung enzymatischer Katalysatoren von beiden Seiten her einstellt, ist eine eingehendere Behandlung dieser Reaktion gerechtfertigt und sogar notwendig. Denn an Vorgängen wie die Spaltung und Bildung des Benzoxynitrils ist Gelegenheit gegeben, die Wirksamkeit enzymatischer und nicht enzymatischer Katalysatoren zu vergleichen und in die Besonderheiten der ersteren einzudringen.

1. Symmetrische Reaktion und Gleichgewicht (ohne Mitwirkung von Emulsin).

Als erste Untersuchungen, welche in diesem Zusammenhang interessieren, sind diejenigen von Lapworth[2]) und Ultee[3]) zu nennen, welche unter anderem die Tatsache behandeln, dass die Synthese des Oxynitrils durch geringe Mengen von Alkali beschleunigt, durch geringe Säuremengen verzögert wird. In einer eingehenderen Arbeit fand dann Wirth[4]), dass Hydroxylionen die Geschwindigkeit, mit der das Gleichgewicht von beiden Seiten erreicht wird, vergrössern, Wasserstoffionen dagegen die beiden Reaktionen verzögern. Ferner fand er, dass die Dissoziation des Oxynitrils bei Verdünnung und bei Erwärmung zunimmt, um bei Konzentrierung und bei Abkühlung wieder zurückzugehen.

Ein wesentlicher Fortschritt ist in diesem Gebiet durch die Messungen von Nordefeldt[5]) erzielt worden, welcher die Geschwindigkeit der Bildung und der Spaltung des Oxynitrils unter dem Einfluss verschiedener Aziditäten untersuchte[6]).

[1]) Greshoff, Arch. d. Pharm. 244, 397 u. 665; 1905.

[2]) Lapworth, Jl Chem. Soc. 83, 995; 1903.

[3]) Ultee, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 28, 1 und 248; 1909.

[4]) Wirth, Arch. d. Pharm. 249, 382, 1911.

[5]) Nordefeldt, Biochem. Zs 118, 15; 1921.

[6]) Siehe bezüglich dieses Einflusses auch die Mitteilung von Krieble und Wieland (Jl Amer. Chem. Soc. 43, 164; 1921).

Es seien zunächst einige Versuche Nordefeldts als Beispiele angegeben. Methodik: Titration der freien HCN mit $AgNO_3$ nach Volhard.

Synthese: Reaktionsgemisch: 5 ccm = 5,141 g C_6H_5CHO + 36,71 ccm HCN-Lösung (1,32 norm.) + 0,06 ccm verdünnte Schwefelsäure.

Stunden	ccm Ag NO_3 für 2 ccm Lösung	% HCN gebunden	$k \cdot 10^3$
2,5	22,7	2,2	0,09
4,75	22,6	2,5	0,05
24	20,8	10,3	0,03
72	17,5	24,6	0,04
198	12,2	47,7	0,04
240	10,5	54,7	0,09

Mittel: $k \cdot 10^3 = 0,06$; pH = 2,9.

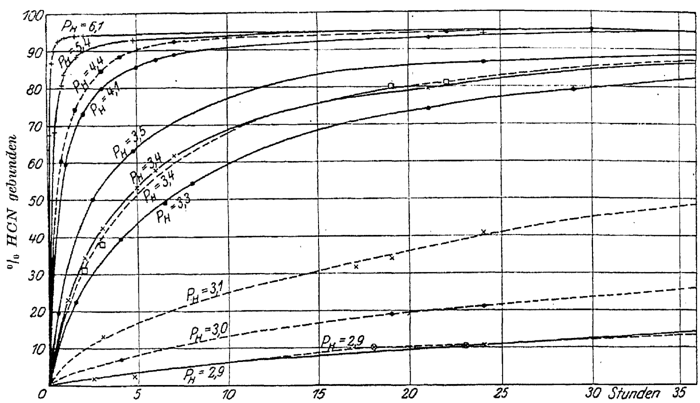


Fig. 37. Die Geschwindigkeit der Oxynitrilsynthese bei verschiedenen Aziditäten. Die Kurven der Versuche bei Gegenwart von Emulsin sind gestrichelt.

Dasselbe Gleichgewicht wurde bei der Spaltung und Bildung des Oxynitrils erhalten. Einige Zahlen bezüglich des Zusammenhanges zwischen Azidität und Spaltungsgeschwindigkeit findet man in folgenden Tabellen. Ausgangsmaterial war ein Reaktionsgemisch mit 95,1% gebundenem HCN; je 2 Proben von 10 ccm wurden schwach alkalisch bzw. sauer gemacht und in Alkohol zu 100 ccm gelöst.

pH = 7,5

Stunden	$AgNO_3$ ccm verbr.	HCN % geb.
0,02	1,55	87,4
6	1,55	87,4
22	1,55	87,4

pH = 2,9

Stunden	$AgNO_3$ ccm verbr.	HCN % geb.
0,02	0,5	95,1
6	0,5	95,1
22	0,5	92,7

Die der Arbeit von Nordefeldt entnommene Fig. 37 veranschaulicht, wie (bei unveränderter Temperatur und Konzentration) die Geschwindig-

keit der Synthese von der Azidität der Lösung bestimmt wird. Zwischen pH = 3 und 6 vermindert sich die Reaktionszeit von etwa zwei Monaten bis auf eine Stunde, d. h. die Geschwindigkeit wird dadurch ausserordentlich vergrössert, um bei Neutralität der Lösung unmessbar gross zu werden.

Der genannte Zusammenhang zwischen Azidität und Geschwindigkeit geht auch aus folgender Zusammenstellung hervor:

pH	2,9	3,0	3,1	3,3	3,4	3,5	4,1	4,4	5,3	6,1	8,0
$k \cdot 10^3$	0,06	0,11	0,3	1,4	2,2	3,6	12	18	50	290	2000

Mit diesen Zahlen ist die Kurve in Fig. 38 gezeichnet.

Auch bei der Spaltung des Oxynitrils findet man einen derartigen Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Azidität (siehe oben).

In einer genügend sauren Lösung (pH = ca. 3) verläuft folglich sowohl die Bildung wie die Spaltung des Oxynitrils äusserst langsam. Damit werden also auch die früheren qualitativen Resultate von Ultée u. a. bestätigt, nach welchen Benzoxynitril in saurer Lösung recht beständig ist.

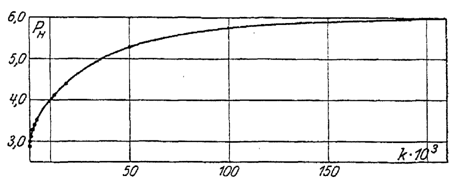


Fig. 38. Azidität und Reaktionsgeschwindigkeit bei der Oxynitrilsynthese.

Der Zusatz von Emulsin hat, wie schon Bayliss (1913) und Krieble (1915) fanden, keine Veränderungen im Gleichgewicht zur Folge. Dagegen wird von Emulsin, wie von anderen Substanzen, die pH steigern, die Geschwindigkeit der Synthese entsprechend vergrössert. In einer Mischung mit Geschwindigkeitskonstante $k \cdot 10^3 = 3{,}6$ wird z. B. durch Zusatz von 0,2 g Emulsin diese auf den Wert 18 erhöht (Nordefeldts Versuche 4 und 9). Der Grund ist, dass das Emulsinpräparat, wie andere Eiweissstoffe, die Säure (Benzoesäure) zu binden vermag, die bei der Oxydation des Aldehyds gebildet wird; diese Bildung geschieht bei reichlicher Luftzufuhr sehr schnell.

Wesentlich ist ausserdem, dass bei Gegenwart von Emulsin das Oxynitril optisch aktiv (asymmetrisch) gefunden wird.

2. Wirkungen von verschiedenen Emulsinpräparaten.

Die ersten Untersuchungen über Einwirkung des Emulsins auf die Bildung und Spaltung des Oxynitrils verdankt man Rosenthaler[1]), welcher damit zweifellos eine Reihe interessanter Probleme entrollt und im Verlauf seiner Arbeiten auch bemerkenswerte Tatsachen gefunden hat.

[1]) Rosenthaler, Biochem. Zs 14, 238; 1908. — 17, 257; 1909. — 19, 186; 1909; 26, 1 u. 7; 1909. — 28, 408; 1910. — 50, 486; 1913. — Arch. d. Pharm. 246, 365; 1908. — 248, 105 u. 534; 1910. — 249, 510; 1911. — 251, 56 u. 85; 1913.

Rosenthalers Befund (Arch. d. Pharm. 1908), dass bei Gegenwart von Mandel-Emulsin aus Benzaldehyd und HCN rechtsdrehendes d-Benzaldehydcyanhydrin (d-Benzoxynitril) entsteht ist eine nunmehr sicher gestellte Tatsache.

Feist[1]) fand linksdrehendes Benzoxynitril, wenn eine Lösung von inaktivem Oxynitril mit Emulsin behandelt und dabei ein Luftstrom durch das Gemisch geleitet wurde. Durch diese Wegführung der Spaltprodukte gelang es ihm, auch aus anderen Oxynitrilen die l-Form im Überschuss zu erhalten. Die Drehungsrichtung der durch Spaltung gewonnenen Oxynitrile war also der durch Synthese dargestellten entgegengesetzt, und mit Hilfe von Emulsin konnten jetzt beide optischen Isomeren erhalten werden. Im Gegensatz zu Rosenthaler nimmt Feist an, dass das d-Oxynitril, welches bei Amygdalinspaltung mit Emulsin gefunden wird, schon als solches im Amygdalin vorhanden ist, und bei der Spaltung frei wird.

Venth[2]), ein Schüler Rosenthalers, findet, dass die asymmetrische Oxynitrilsynthese sich bei Verwendung einer ganzen Reihe von enzymartigen Präparaten vollzieht, die aus den verschiedensten Pflanzen gewonnen werden können, wobei in der Regel d-Oxynitril erhalten wird. In einem Falle aber (mit einem Präparat aus den Blättern von Taraktogenos Blumei) erhielt er die l-Form, wodurch er die Existenz eines synthetischen l-Enzymes (l-Oxynitrilese) bestätigt findet.

Nordefeldt[3]) hat eingehend untersucht, wie sich in einer Lösung, welche Mandel-Emulsin als Katalysator enthält, die optische Drehung der Lösung mit der Zeit ändert, und wie diese zeitliche Drehungsänderung von der Temperatur und der Emulsinmenge abhängt. Die folgende Darstellung schliesst sich zum grossen Teil an die Untersuchungen Nordefeldts an.

Emulsinpräparate: Wegen der Herstellung des Roh-Emulsins sei auf das S. 212 Gesagte verwiesen. Auch für die Herstellung solcher Präparate, welche im System Benzaldehyd, Blausäure, Oxynitril wirken sollen, empfiehlt sich bei der Herstellung aus Mandeln die Extraktion in schwach alkalischer Lösung.

Rosenthaler hat seine systematischen Versuche mit einem käuflichen Präparat von Th. Schuchardt ausgeführt (vgl. Biochem. Zs 14, S. 242). Er schrieb die von ihm entdeckte asymmetrische, synthetisierende Wirkung des Emulsins einem besonderen Bestandteil desselben zu, den er

syn-Emulsin (σύν-Emulsin, σ-Emulsin) nannte.

H. E. Armstrong und Horton[4]) sprechen im gleichen Sinne von einer Benzcyanase, und nach einem Nomenklaturvorschlag des Verfassers[5]) wäre ein Enzym, dessen Wirksamkeit in der Synthese von d-Oxynitril besteht, als d-Oxynitrilese zu bezeichnen.

Nach Rosenthaler konnte das syn-Emulsin in mehr oder weniger reiner Form dadurch isoliert werden, dass eine Emulsinlösung während 1 bis 2 Wochen auf 40—45° erwärmt wurde, oder durch Behandeln von Emulsin

[1]) Feist, Arch. d. Pharm. 247, 226 und 542; 1909. — 248, 101; 1910.
[2]) Venth, Diss. Strassburg 1912.
[3]) Nordefeldt, Biochem. Zs 130; 1922.
[4]) H. E. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 82, 349; 1910.
[5]) Euler, H. 74, 13; 1911.

zuerst mit Schwefelsäure und dann mit einer der Säure äquivalenten Menge von Alkalihydroxyd, wodurch in beiden Fällen die übrigen enzymatischen Bestandteile beinahe vollständig zerstört wurden. Die enzymatische Wirkung des syn-Emulsins wurde vom Überschuss an Benzaldehyd, nicht aber von Cyanwasserstoff, geschwächt. Die Eigenschaft des syn-Emulsins, zur Bildung von optisch aktiven Oxynitrilen zu führen, zeigte sich nicht nur beim Benzaldehyd, sondern es gelang Rosenthaler, von verschiedenen Aldehyden ausgehend, eine ganze Reihe von asymmetrischen Oxynitrilen darzustellen, von welchen die meisten rechtsdrehend waren.

Als Krieble[1]) fand, dass Präparate aus Blättern von wilder Kirsche (Prunus serotina) und aus Pfirsichblättern linksdrehendes Oxynitril gaben, wurde darin eine neue Oxynitrilese, l-Oxynitrilese, angenommen.

Etwa gleichzeitig mit Krieble hat auch Rosenthaler[2]) Fälle mitgeteilt, in welchen er die Bildung von l-Oxynitril beobachtet hat.

dia-Emulsin. Zum Unterschied von syn-Emulsin wurde von Rosenthaler der enzymatische Bestandteil des Emulsins, welcher Amygdalin wie übrige β-Glukoside spaltet, dia-Emulsin ($\delta\iota\grave{\alpha}$-Emulsin, δ-Emulsin) genannt.

Dieses Enzym soll nach Rosenthaler isoliert werden können, wenn eine Emulsinlösung mit einer gesättigten Lösung von Magnesiumsulfat oder mit Kupfersulfat gefällt wird, wobei es im Filtrat verbleibt. Er findet jedoch, dass die Methode mit Kupfersulfat bisweilen versagen kann. Durch Erwärmung während längerer Zeit auf 40—45° wurde das dia-Emulsin grösstenteils zerstört, eine Lösung von syn-Emulsin ertrug aber eine kurze Erhitzung bis 70—80°.

Weil das dia-Emulsin aus Amygdalin Benzaldehyd und Cyanwasserstoff abspaltet, sollte es auch das Zwischenprodukt Benzoxynitril zerlegen können. Die synthetisierende Wirkung des syn-Emulsins würde folglich bei Anwesenheit von dia-Emulsin mehr oder weniger geschwächt, wodurch der sehr variierende Effekt verschiedener Emulsinpräparate des Handels erklärt wäre.

Von Nordefeldts[3]) Angaben über sein Mandel-Emulsinpräparat sind zunächst diejenigen erwähnenswert, welche sich auf das Verhalten bei der Dialyse beziehen.

Die Dialysen gingen bei Anwesenheit von Toluol in einer Anzahl Kollodiumschläuchen vor, je etwa 15 ccm fassend, 3 Tage lang, mit oft wiederholtem Umtausch von Aussenflüssigkeit, deren totales Volumen 1500 ccm betrug, und die dann bei 30—35° zum Volumen 50 ccm im Vakuum eingeengt wurde.

Aschenanalyse.

PO_4	75,79 %
K_2O	14,55 „
CaO	7,45 „
MgO	1,48 „
SiO_2	0,32 „

[1]) Krieble, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1643; 1913.
[2]) Rosenthaler, Arch. d. Pharm. 251, 85; 1913.
[3]) Nordefeldt, Biochem. Zs 131, 390; 1922.

Dialyse I. Emulsinlösung 300 ccm.

Nichtdialysierte Lösung	Dialysierte Lösung (Innenflüssigkeit)	Aussenflüssigkeit
pH = 6,08	pH = 6,04	pH = 5,73
Trockensubstanz = 12,1 mg/ccm	Trockensubstanz = 9,2 mg/ccm	Trockensubstanz = 14,3 mg/ccm = 2,4 mg/ccm von der ursprünglichen Lösung. Davon Kohlehydrate (als Glukose berechnet) 3,0 mg/ccm = 21 % der Trockensubstanz
Asche = 0,84 mg/ccm = 6,94 % der Trockensubstanz	Asche nicht nachweisbar	Asche = 4,5 mg/ccm = 35 % der Trockensubstanz

Dialyse II.

pH = 6,39	pH = 5,88	pH = 5,88
Trockensubstanz = 12,2 mg/ccm	Trockensubstanz = 9,7 mg/ccm	Trockensubstanz = 5,7 mg/ccm. Davon Kohlehydrate (als Glukose berechnet) 1,3 mg/ccm = 23 % der Trockensubstanz
Asche = 0,9 mg/ccm = 7,37 % der Trockensubstanz	Asche nicht nachweisbar	Asche = 1,9 mg/ccm = 33 % der Trockensubstanz

Die Aussenflüssigkeit enthielt nach der Dialyse, ausser einer geringen Menge stickstoffhaltiger Stoffe (die beim Erhitzen der Lösung koagulierten), lösliche Kohlehydrate, die nach Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure und Bestimmung nach Bertrands Methode, als Glukose berechnet, bzw. 21 % und 23 % von dem Trockengewicht der Substanz ausmachten. Ausserdem enthielt die Aussenflüssigkeit anorganische Stoffe (hauptsächlich Kalium- und Kalziumphosphat) bis zu einem Gehalt von bzw. 35 % und 33,3 %.

Diese nach der Dialyse entfernte Aussenflüssigkeit zeigte an sich keine merkbare optisch-aktivierende Wirkung bei der Oxynitrilsynthese und enthielt also keine nachweisbare Menge des betreffenden Katalysators.

Die dialysierte Emulsinlösung, die Innenflüssigkeit, zeigte auch nur geringe oder keine katalytische Wirkung. Wenn aber die beiden Flüssigkeiten gemischt wurden, zum gleichen Volumen wie vor der Dialyse, wurde wieder deutliche optische Aktivität erhalten, obgleich nicht eine so starke wie mit der ursprünglichen undialysierten Lösung.

Indessen tritt bei Verwendung nur dialysierter Lösung eine neue Erscheinung auf. Im Gegensatz zu einer gewöhnlichen Emulsinlösung, aus welcher bei Vermischung mit dem Substrat sofort reichlich Protein ausfällt, ergibt eine dialysierte Lösung keine Fällung, wenn sie dem Substrat zugesetzt wird, sondern höchstens eine starke Opaleszenz. Diese verschwindet aber nicht und kann auch nicht durch Filtrierpapier entfernt werden, weshalb die Polarisierung in einem längeren Rohr dann unmöglich und auch in $^1/_2$ dm-Rohr so erschwert ist, dass zuverlässige Resultate nicht haben gewonnen werden können, obgleich es den Eindruck gemacht hat, dass optische Aktivität dabei nicht entstanden ist.

Falls aber eine solche dialysierte Emulsinlösung wieder mit Aussenflüssigkeit versetzt wird, erhält man mit dem Substrat wieder die Proteinfällung und deutliche optische Aktivität wird ausgebildet; auch die auf 80° erhitzte Aussenflüssigkeit und selbst die Asche genügt zu dieser Reaktivierung; ausser Phosphat zeigen auch $MgSO_4$ und andere Salze mehrwertiger Ionen diesen Effekt.

3. Kinetik der enzymatischen Oxynitrilbildung.

Zunächst zeigte sich, dass die optische Aktivität mit der Zeit abnimmt, während die totale Menge des Oxynitrils konstant bleibt.

Versuch: 0,1 g Emulsin + 10 ccm Wasser + 9 ccm HCN (1,1 N) + 1,05 g C_2H_5CHO. Methode I. Titriertes Volumen 5 ccm. $AgNO_3$ 0,05 N.

a) Temperatur 17°.

Stunden	Drehung in Graden	HCN % geb.	$k \cdot 10^3$ berechnet
1	0,98	51,2	
			4,2
3	1,35	65,4	
70	1,00	70,1	

b) Temperatur 36°.

Stunden	Drehung in Graden	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	1,05		
1/2	1,17	64,3	
			7,1
1	1,13	68,3	
1 1/2	1,05	69,3	
6 1/2	0,80	69,5	

„Die Bildungsgeschwindigkeit sowohl asymmetrischen wie totalen Oxynitrils steigt also mit der Temperatur. Ehe die totale Synthese ihr Maximum noch erreicht hat, fängt indessen die Asymmetrie an abzunehmen, und dies geschieht schneller bei höherer Temperatur, wodurch sich erklärt, dass dieselbe dann nicht so starke Entwicklung erreicht. Dies deutet darauf hin, dass ein die Asymmetrie aufhebender Faktor in die Reaktion eingreift, und der Einfluss dieses Faktors scheint mit steigender Temperatur zuzunehmen.“

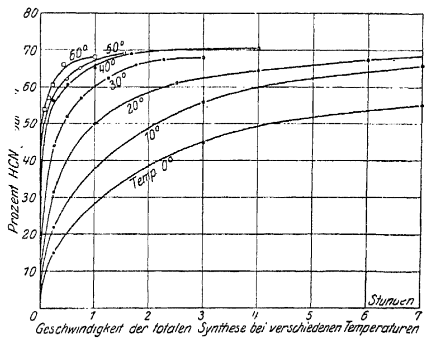


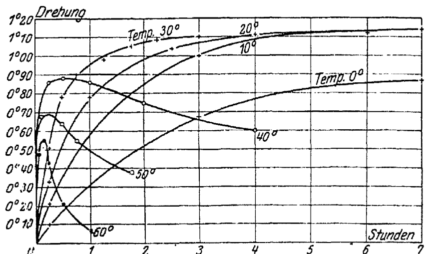
Fig. 39.

Den Verlauf der totalen Synthese bei verschiedenen Temperaturen ersieht man aus der Fig. 39. Man sieht, wie die Geschwindigkeit der totalen Synthese steigt. Von der Temperatur unabhängig steigt in allen Fällen die Menge des totalen Oxynitrils zu ungefähr ein und demselben Endwert, und dieser erleidet dann mit der Zeit keine Veränderung.

Innerhalb jedes einzelnen Versuches sinken die Werte der Reaktionskonstanten k ziemlich schnell mit der Zeit, was sich daraus erklärt, dass das zurückbleibende Benzaldehyd von der Luft oxydiert wird und dadurch die Azidität der Lösung immer mehr steigert, wodurch die Synthese langsamer geht.

Die optische Aktivität dagegen bildet sich bei niedriger Temperatur zwar langsamer aus, wie das totale Oxynitril, und bei höherer Temperatur schneller, aber das erreichte Maximum bleibt nicht konstant,

sondern beginnt, wie schon Rosenthaler[1]) gefunden hat, asymptotisch gegen Null zu sinken. Mit steigender Temperatur wird dieses Maximum immer niedriger und seine Abnahme immer schneller, wie die Fig. 40 zeigt.



Ausbildung der optischen Aktivität bei verschiedenen Temperaturen

Fig. 40.

„Augenscheinlich steigt die Stärke des inaktivierenden Faktors stark mit der Temperatur, so dass er immer vollständiger und schneller die optisch aktiven Oxynitrilmoleküle umwandelt, die während der Einwirkung des Emulsinkatalysators entstehen."

Je geringer der Säuregrad der Lösung ist (je grösser also die pH-Werte sind), desto rascher nimmt die Ausbildung der optischen Aktivität ab. In einer fast neutralen Lösung findet sie augenscheinlich kaum die Zeit, sich auszubilden, bevor sie wieder verschwunden ist.

Der Zusammenhang zwischen Inaktivierungsgeschwindigkeit und Azidität ergibt sich aus folgenden Zahlen:

[1]) Leider ist das von Rosenthaler beigebrachte Versuchsmaterial oft wenig vollständig und dies macht eine Beurteilung der darin enthaltenen Tatsachen schwierig. Zu dem hier besprochenen Punkt gibt Rosenthaler ein reichlicheres Zahlenmaterial, welches deswegen hier mitgeteilt sei (Biochem. Zs 50, 490).

Bezeichnung des Präparates	Synthetischer Versuch				Nitrilspaltung
	Drehung (Grade) des d-Benzaldehyd-cyanhydrins nach				Drehung (Grade) des l-Benzaldehydcyanhydrins
	2,5 St.	St.	12 St.	24 St.	
Emulsin Merck	+ 5,10	+ 5,08	+ 4,80		— 1,18
„ Schuchardt. . .	+ 3,29	+ 3,45	+ 3,37		— 0,40
Enzympräparat aus					
bitteren Mandeln . . .	+ 3,82	+ 4,42	+ 4,04		— 0,15
Äpfelkernen	+ 4,96	+ 5,24	+ 4,66		—
Kirschkernen	+ 5,08	+ 5,14	+ 4,88		— 0,95
Aprikosenkernen . . .	+ 0,69	+ 0,67	+ 0,63		0 (auch nach Verseifung)
süssen Aprikosenkernen	+ 5,40	+ 5,32	+ 4,78		— 0,15
Pfirsichkernen	+ 4,47	+ 4,44	+ 4,27		Spuren (nach Verseifung + 0,5)
Zwetschgenkernen . .	+ 1,38	+ 1,42	+ 1,96	+ 1,47	Spuren (nach Verseifung + 0,16)
Holzbirnenkernen . . .	+ 3,06	+ 2,90	+ 2,82		— 0,65

pH =	3,3	4,5	4,7	5,2	5,4	5,7	6,1
Mittel $k' \cdot 10^3$ =	sehr klein	1,6	2,3	8,1	11,8	23,2	63,3

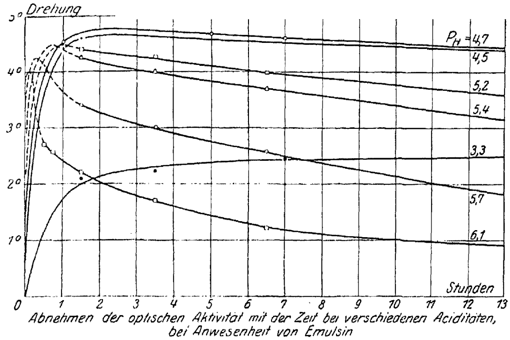


Fig. 41.

In der Fig. 42 ist diese Beziehung graphisch dargestellt. Die untere Kurve ist der 1. Mitteilung von Nordefeldt (Biochem. Zs 118) entnommen.

Nordefeldt hat auch noch erwogen, ob die beobachtete optische Inaktivierung mit einer nach der Gleichung

$$C_6H_5 \cdot CH\begin{matrix} OH \\ CN \end{matrix} + 2\,H_2O \rightleftarrows C_6H_5 \cdot CH\begin{matrix} OH \\ CO_2NH_4 \end{matrix}$$

verlaufenden Hydrolyse und Bildung von Mandelsäure zusammenhängen kann. — Hierbei würde die Rechtsdrehung der Flüssigkeit immer mehr abnehmen, weil aus rechtsdrehendem Oxynitril, wie bekannt, linksdrehende Mandelsäure gebildet wird. Da aber der Zahlenwert der spezifischen Drehung bei dieser Mandelsäure (etwa — 156°, Lewkowitsch) vielmals grösser ist als beim Oxynitril (etwa + 14°, Feist) sollte zwar die Mischung nach einiger Zeit inaktiv, aber später immer stärker linksdrehend werden.

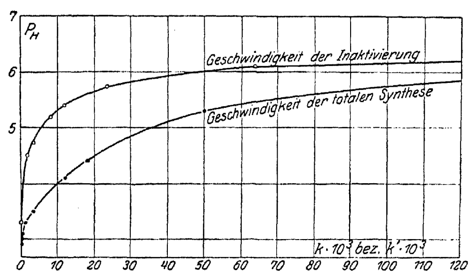


Fig. 42.

Anhaltspunkte für das Auftreten von Mandelsäure unter den Bedingungen der oben erwähnten Versuche hat Nordefeldt jedoch nicht gefunden. Demgemäss scheint auch sein Schluss berechtigt, dass es sich hier um eine Racemisierung in inaktives Oxynitril handelt.

Für kleine Emulsinmengen ist die nach einer gewissen Zeit eintretende optische Aktivität des Substrats der Emulsinmenge proportional. Das wird aus folgenden Zahlen ersichtlich:

Substrat = 14,1 ccm HCN (1,4 N, in 96%igem Alkohol gelöst) + 2,09 g C_6H_5CHO + 10 ccm Azetatpuffer (1 N, in 47%igem Alkohol gelöst, pH = 4,4),

ccm Emulsinlösung	5	7	10	12	15
Drehung nach 8 Stunden	0,3	0,5	0,75	0,90	1,15

Bei Annäherung an das Maximum der optischen Aktivität wird natürlich die absolute Wirkung weiterer Emulsinmengen kleiner, wie die folgende Figur 43 zeigt.

Temperatureinfluss auf die Emulsinwirkung. Stabilität des asymmetrisch wirksamen Katalysators.

Krieble und Wieland[1]) fanden bei ihrer Untersuchung mit einem Präparate aus Pfirsichblättern, dass je nach der Temperatur die totale oder die asymmetrische Synthese vorherrschend wurde, und zwar letztere bei 0°, erstere bei 35°.

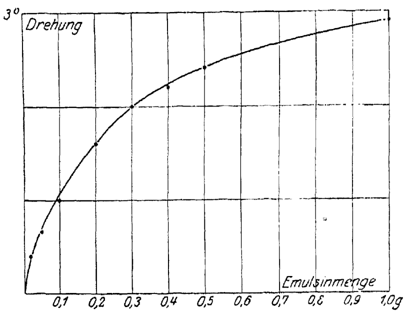


Fig. 43.

Nordefeldt gibt Versuche mit Mandelemulsin an.

Einige Fläschchen wurden mit je 10 ccm einer Emulsinlösung (4,09% Trockensubstanz, pH = 5,9) beschickt und blieben während einer Stunde bei konstanter Temperatur, wonach sie rasch bis Zimmertemperatur abgekühlt wurden. Jetzt wird zu den mehr oder weniger koagulierten Lösungen als Puffer 10 ccm Azetat (1 N, in 47%igem Alkohol gelöst) von pH = 5,0, darauf 15 ccm HCN (1,34 N, in 96%igem Alkohol gelöst) und 2,13 g C_6H_5CHO zugesetzt. Nach einer Stunde bei 18° wurde filtriert. 2 dm-Rohr.

Temperatur	40°		50°		60°			70°		73°		76°		78°		80°	
Stunden	2	6	2	25	2	3	25	2	6	2	6	2	6	2	6	2	25
Drehung in Graden . .	3,00	3,00	2,95	2,35	2,65	2,85	2,00	2,30	2,40	1,75	1,75	0,45	0,45	0,25	0,25	0	0

„Zwischen 70° und 80° wird also die hier wirksame Substanz schnell inaktiviert, um nach einer Stunde Erhitzen bis 80° in Bezug auf ihr Vermögen optisch aktives Oxynitril zu bilden, ganz inaktiv zu werden. Dies gilt wenigstens für pH = ca. 5,9, obgleich es möglich ist, dass in neutraler salzhaltiger oder schwach alkalischer Lösung, wo die Koagulierung nicht so leicht stattfindet, die Aktivität auch nach stärkerem Erhitzen weiter bestehen kann."

Nitrilsynthese durch nichterhitztes und durch erhitztes Emulsin.

Versuch 12: Emulsinlösung = 1 g Emulsin + 100 ccm Wasser, filtriert. Hiervon 1 Teil inaktiviert durch 1 Stunde Erhitzung bis zu 100° und Filtrierung. *Reaktionsgemisch:* 4,53 ccm

[1]) Krieble und Wieland, Jl Amer. Chem. Soc. 43, 164; 1921. — Siehe auch Krieble, ebenda 35, 1643; 1913.

HCN (2,06 N) + 1,0 g C_6H_5CHO + 4,53 ccm von bzw. aktiver oder inaktiver Emulsinlösung oder Wasser. Temp. 17°.

Nichterhitztes Emulsin.				Erhitztes Emulsin.				Ohne Emulsin.			
Stunden	Drehung in Graden	HCN	$k \cdot 10^3$	Stunden	Drehung in Graden	HCN	$k \cdot 10^3$	Stunden	Drehung in Graden	HCN	$k \cdot 10^3$
2	0,70	46,1		2	—	40,3		2	—	32,0	
			1,8				0,9				0,6
4	0,82	54,9		4	—	46,1		4	—	37,4	
			0,8				0,5				0,2
6	0,80	57,8		6	—	49,0		6	—	38,8	
			0,5				0,2				0,1
19	0,76	67,5		19	—	55,3		19	—	42,2	
											0,2

Eine auf 100° erhitzte (und filtrierte) Emulsinlösung, die keine optische Aktivität des Oxynitrils erzeugt, bewirkt also noch eine Steigerung der totalen Synthesegeschwindigkeit. Diese Wirkung ist nicht als enzymatisch zu betrachten, sondern hängt von dem Gehalt säurebindender Proteinsubstanz, die in der Lösung noch zurückbleibt, ab. Als Säure kommt hier Benzoesäure (aus dem Benzaldehyd stammend) in Frage.

Nordefeldt fasst seine experimentellen Ergebnisse sachgemäss folgendermassen zusammen (Biochem. Zs 131, 409).

„Die Schnelligkeit, womit die optische Aktivität ausgebildet wird, wird augenscheinlich von der totalen Synthesegeschwindigkeit bestimmt, welche ihrerseits durch die Azidität reguliert wird. Indessen wirkt noch ein Faktor auf die optische Aktivität ein, nämlich die intramolekulare Umlagerungsgeschwindigkeit, wodurch schliesslich eine Mischung gleich vieler rechts- und linksdrehender Moleküle ausgebildet wird. Die Geschwindigkeit dieser razemisierenden Umlagerung, die in dem ganzen untersuchten Aziditätsgebiet die Synthesegeschwindigkeit nicht erreicht, scheint mit steigendem pH und mit steigender Temperatur zu steigen, wodurch die optische Aktivität schnell abnimmt. In völlig neutraler Lösung scheint die Geschwindigkeit der Inaktivierung dieselbe Höhe zu erreichen wie die Synthesegeschwindigkeit, d. h. beide werden unmessbar gross."

„Das gewonnene d-Oxynitril ist labil, und die Drehung der Lösung nimmt von selbst ab, ohne Mitwirkung eines Enzyms oder eines anderen Katalysators. Über die Geschwindigkeit, mit der die Drehung abnimmt, ist folgendes ermittelt worden:

1. Sie steigt mit einem Temperaturkoeffizienten $k_{t+10} : k_t =$ ca. 3,2.
2. Sie nimmt mit steigender Azidität innerhalb des Gebietes pH = 3 bis 6,5 ab.
3. Sie erreicht die Höhe der totalen Synthesegeschwindigkeit erst im Neutralpunkt, wo beide unendlich gross werden und wo die optische Aktivität ebenso rasch verschwindet, wie sie entsteht."

Man kann also sagen, dass die symmetrische Oxynitrilbildung als nicht enzymatische Reaktion nunmehr im wesentlichen aufgeklärt ist. Dagegen lässt sich das Ansteigen und Abfallen der Drehung bzw. der Asymmetrie auf Grund der vorliegenden Daten noch nicht in einfacher Weise restlos beschreiben.

Über nicht-enzymatische, asymmetrisch-katalytische Wirkungen.

Wie Fischer[1]) schon 1898 betont hat, ist die Spezifität der Enzyme optischen Antipoden gegenüber darauf zurückzuführen, dass sie als asymmetrisch gebaute Katalysatoren[2]) wirken; man wird also nicht zu erwarten haben, dass die asymmetrische Katalyse auf einer besonderen Fähigkeit der Enzyme beruht, sondern dass eine solche asymmetrische Wirkung auch durch nicht enzymatische Katalysatoren bekannter Konstitution hervorgerufen werden kann. Fischer hat selbst einige Versuche über die katalytische Wirkung der d- und l-Formen einiger Säuren angestellt, und in ähnlichem Sinne hat Marckwald[3]) eine Verseifung von d- und l-Weinsäureester durch Nikotin vorgenommen.

Im I. Teil dieses Buches (S. 262 ff.) wurde bereits auf die Erfolge hingewiesen, welche Mc Kenzie[4]) hinsichtlich asymmetrischer Synthesen erzielt hat. Dieser Forscher geht in seinen Synthesen von symmetrischen Molekülen, Benzoylameisensäure bzw. Brenztraubensäure aus, macht dieselben durch Einführung eines optisch aktiven Radikals asymmetrisch und erreicht dadurch, dass aus dem symmetrischen Teil der Moleküle durch Reduktion statt eines racemischen Reaktionsproduktes überwiegend eine der optisch aktiven Formen entsteht.

Noch ausgesprochener ist der katalytische Charakter der asymmetrischen Reaktionsbeeinflussung bei einer von Markwald[5]) durchgeführten Synthese: Aus Methyläthylmalonsäure wird durch Erhitzen des sauren Salzes Carboxyl abgespalten und es entsteht eine Valeriansäure, welche ein „asymmetrisches Kohlenstoffatom" enthält. Nimmt man die Erhitzung der Methyläthylmalonsäure in Gegenwart von Brucin vor, so erhält man, wenn man den Brucinrest entfernt, überwiegend die eine (l-) Spiegelbildform des Reaktionsproduktes.

Einen weiteren interessanten Fall, die Zersetzung der d- und l-Kamphokarbonsäure haben Bredig und Fajans[6]) beschrieben; die bemerkenswerten theoretischen Darlegungen von Fajans[7]) sind bereits im I. Teil (S. 269 ff.) referiert worden.

[1]) E. Fischer, H. 26, 83; 1898.

[2]) Auch hier sei nochmals auf die ausgezeichneten Untersuchungen von Dakin (Jl of Physiol. 30 u. 32; 1903—1905) verwiesen.

[3]) Marckwald, Chem. Ber. 21, 723; 1898.

[4]) Mc Kenzie, Jl Chem. Soc. 85, 1249; 1904. — 87, 1373; 1905. — 89, 365; 1906.

[5]) Marckwald, Chem. Ber. 37, 349, 1368; 1904.

[6]) Bredig und Fajans, Chem. Ber. 41, 752; 1908.

[7]) Fajans, Zs f. physik. Chem. 73, 25; 1910.

Besonders ist aber hier die Arbeit von Bredig und Fiske[1]) zu erwähnen, in welcher eine asymmetrische Oxynitrilbildung durch Chinin und Chinidin beschrieben wird. Wir führen hier einen der zwei von Bredig und Fiske mitgeteilten Hauptversuche ausführlich an:

Von den beiden Hauptversuchen der folgenden Tabelle ist der eine mit Chinin, der andere mit Chinidin, die Kontrollversuche (Nullversuche) sind mit Chinidin ausgeführt, der eine ohne Blausäure und der andere ohne Benzaldehyd, aber in diesen Fällen wurde an Stelle der zweiten Komponente des Cyanhydrins so viel (ca. 8 g) racemische Mandelsäure, als etwa einer gesättigten Lösung derselben entsprach, zugegeben. „Diese Nullversuche wurden ausgeführt, um zu zeigen, dass unter den gegebenen Umständen schon fertige Mandelsäure durch eventuelle Einwirkung des Alkaloids nicht aktiviert wird, und andererseits um zu zeigen, dass optisch-aktive Mandelsäure nur dann erhalten wird, wenn sich ihr Nitril erst bei Gegenwart von Alkaloid synthetisch gebildet hatte."

„Es wurden 50 ccm Benzaldehyd (also 0,5 Mol) in einem gewöhnlichen 250 ccm-Masskolben in ca. 170 ccm Chloroform gelöst, hierauf wurden 20 ccm wasserfreier Blausäure (also 0,5 Mol) zugesetzt und das Gemisch eine Stunde lang im Thermostaten bei 25° stehen gelassen; dann wurde es bis zur Marke mit Chloroform aufgefüllt und 0,5 g des Alkaloids zugegeben. Nach 24 Stunden wurde der Inhalt des Kolbens in einen grossen Schütteltrichter gegossen und mit 100 ccm einer ca. 4-normalen wässerigen Lösung von Schwefelsäure 5 Minuten tüchtig geschüttelt. Von jeder Schicht wurde dann eine Probe herausgenommen und im 2 dm-Rohr mit Natriumlicht „polarisiert" (Drehung I). Dann wurde die chloroformische Schicht nochmals mit 100 ccm der Säure behandelt und darauf die beiden Proben wie oben polarisiert (Drehung II). Die chloroformische Schicht wurde dann mit 100 ccm konzentrierter wässeriger Salzsäure bei Zimmertemperatur 1 Stunde stehen gelassen und dann das Chloroform abdestilliert. Ausser der wässerigen Schicht blieb (wenn vorhanden) noch im Kolben etwas freier Benzaldehyd zurück. In diesen beiden Schichten schieden sich beim Abkühlen reichlich Kristalle von Mandelsäure ab. Um aber eine eventuelle Pasteursche Kristallisationstrennung zu vermeiden, wurden zunächst wieder alle Kristalle durch Zusatz von Wasser gelöst, erst dann wurde die wässerige Schicht von dem Benzaldehyd getrennt und letzterer mit Wasser mehrmals ausgewaschen, um alle eventuell vorhandene Mandelsäure daraus zu entfernen. Die wässerige Schicht samt allen Waschwässern wurde dann auf 500 ccm ergänzt und in einem 4 dm-Rohr polarisiert (Drehung III). (Die Nullversuche wurden von hier ab nicht weitergeführt.) Die Lösung wurde dann etwas eingedampft, mit Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion versetzt, das Ganze nochmals zu 500 ccm ergänzt und mit 50 ccm Benzol ausgeschüttelt. Der benzolische Auszug wurde in einem 2 dm-Rohr und die wässerige alkalische Lösung selbst in einem 4 dm-Rohr polarisiert (Drehung IV und V).

	Drehung I		Drehung II		Drehung III	Drehung IV	Drehung V
	Chloroform-schicht	Wässerige Schicht	Chloroform-schicht	Wässerige Schicht			
Nullversuche:							
1. Ohne Blausäure . .	0,00°	+ 2,80°	0,00°	0,00°	— 0,01°	—	—
2. Ohne Benzaldehyd	— 0,02°	+ 2,50°	+ 0,01°	— 0,01°	— 0,01°	—	—
Hauptversuche:							
3. Mit Chinin	+ 0,23°	— 2,24°	+ 0,32°	— 0,18°	— 0,81°	— 0,01°	— 0,60°
4. Mit Chinidin	— 0,27°	+ 2,43°	— 0,38°	— 0,33°	+ 0,92°	0,00°	+ 0,71°

Wie man schon durch den blossen Augenschein erkennen konnte, beschleunigen geringe Mengen der Alkaloide die Addition der Blausäure an den Benzaldehyd ausserordentlich stark. Da diese Reaktion nämlich mit einer starken

[1]) Bredig und Fiske, Biochem. Zs 46, 7; 1912.

Kontraktion verbunden ist, konnte man diese letztere in derselben Zeit an den mit Alkaloiden versetzten Versuchen sehr deutlich wahrnehmen, während in den Nullversuchen eine solche Kontraktion nicht sichtbar war."

„Aus der Tabelle geht hervor, dass die chloroformische Schicht in den Nullversuchen nach Ausschüttelung des Alkaloids mittels Schwefelsäure optisch inaktiv war, während in den Hauptversuchen, in denen sich Cyanhydrin gebildet hatte, diese chloroformischen Schichten eine erhebliche Drehung zeigten; und zwar zeigte sich hier bei Anwendung des linksdrehenden Chinins als Katalysator eine Rechtsdrehung, bei Anwendung des rechtsdrehenden Chinidins als Katalysator eine Linksdrehung."

Die asymmetrische Oxynitrilsynthese von Fajans wurde von Bayliss[1]) experimentell bestätigt, welcher gleichfalls fand, dass der verwendete Katalysator auch bei Dissoziation des inaktiven Oxynitrils die Reaktionsgeschwindigkeit desselben Isomeren beschleunigt wie bei Synthese.

Auch aus diesen Versuchen geht also deutlich hervor, dass zwischen den asymmetrisch-katalytischen Wirkungen z. B. eines Alkaloids und denen eines Enzyms prinzipielle Unterschiede nicht bestehen. Nur die quantitative Durcharbeitung eines solchen Falles steht noch aus. Bezüglich der Oxynitrilbildung fehlt zunächst die genaue Kenntnis der Dissoziationskonstanten dieses Stoffes als Säure.

Anti-Stoffe nach subkutaner Emulsin-Injektion.

Da in diesem Kapitel die Amygdalinspaltung besonders behandelt worden ist, so müssen auch diejenigen Versuche erwähnt werden, bei welchen eine Beeinflussung der Amygdalinspaltung durch Serum nach subkutaner Injektion von Emulsin beobachtet wurde.

Im Anschluss an die Versuche von Beitzke und Neuberg (s. I. Tl. S. 277) hat sein Schüler Ohta Kaninchen mit Emulsin Kahlbaum vorbehandelt (8 Injektionen von je 0,1 g Emulsinpräparat von „enormem Spaltungsvermögen gegen Amygdalin"). Bezüglich der spaltenden Wirkung (bestimmt wurde die aus Amygdalin gespaltene Glukose) kommt Ohta zum Resultat, dass an der hemmenden Wirkung des Imunserums im Vergleich mit Normalserum kein Zweifel bestehen kann.

Immerhin erscheint es nicht ausgeschlossen, dass die Unterschiede zwischen Immunserum und Normalserum, welche Otha[2]) gefunden hat, auf Verschiedenheiten der Azidität zurückzuführen sind, entsprechend einer früher von Bayliss[3]) geäusserten Vermutung.

[1]) Bayliss, Jl of Physiol. 46, 236; 1913.
[2]) Ohta, Biochem. Zs 54, 430; 1913.
[3]) Bayliss, Jl of Physiol. 43, 455; 1912.

E. Methoden zur Verfolgung der Spaltung der Nitrilglukoside.

Es kommen hier drei Methoden in Betracht:

1. Die polarimetrische Methode (bei Anwendung der optisch-aktiven Formen) ist zur Messung der Amygdalin-Hydrolyse zuweilen in Anwendung gekommen. Selbst unter Beobachtung der erforderlichen Massnahmen zur Aufhebung der Mutarotation erscheint diese Methode hier nicht empfehlenswert, da die Berechnung der einzelnen Substanzkonzentrationen aus der Gesamtdrehung der Lösung wegen des gleichzeitigen Ablaufes mehrerer Teilreaktionen unsicher wird.

2. Die Bestimmung der gebildeten Glukose nach einer geeigneten Reduktionsmethode. Durch die anwesende Blausäure wird die Methode von Pavy-Kumagawa-Suto unanwendbar, wie Caldwell u. Courtauld[1]) erkannt haben.

H. E. Armstrong, E. F. Armstrong u. Horton (Proc. Roy. Soc. 80) haben die durch Schwefelsäurezusatz inaktivierten Proben mit Pottasche versetzt, die Blausäure durch ½stündige Destillation mit Wasserdampf vertrieben und die Glukose nach einem Reduktionsverfahren von Brown, Morris und Miller bestimmt.

Willstätter und Csányi[2]) ziehen es vor „aus der schwefelsauren Flüssigkeit, 1—2 ccm 10%iger Schwefelsäure auf 20 ccm enthaltend, die Blausäure mit Wasserdampf abzutrennen, was in 30 Min. vollständig gelang". Amygdalin wird durch die Dampfdestillation nicht messbar hydrolysiert. Hierauf bestimmen sie den Zucker nach Sonntag[3]) und Bertrand[4]).

3. Auld[5]) hat die Amygdalinspaltung durch die entbundene Blausäure gemessen, wobei natürlich nur eine der Teilreaktionen ermittelt wird. Die Blausäurebestimmung geschah nicht durch Titration mit Silbernitrat, sondern mit einer von Dunstan und Henry[6]) beschriebenen titrimetrischen Methode, welche darin besteht, dass Blausäure in Gegenwart von Natriumbikarbonat mit einer titrierten Jodlösung nach der Gleichung umgesetzt wird:

$$HCN + J_2 = CNJ + HJ.$$

Berechnung der enzymatischen Wirksamkeit.

Bei der Amygdalinspaltung handelt es sich nicht um eine einfache Reaktion, sondern um die gleichzeitige Wirkung zweier Enzyme, nämlich der Amygdalase und der „Prunase", evt. auch noch einer Oxynitrilase; Reaktions-

¹) Caldwell u. Courtauld, Jl Chem. Soc. 91, 666; 1907.
²) Willstätter u. Csányi, H. 117, 172 und zwar 177; 1921.
³) Sonntag, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt, 19, 447; 1903.
⁴) Bertrand, Bull. Soc. Chim. (3) 35, 1285; 1906.
⁵) Auld, Jl Chem. Soc. 93, 1251 und zwar 1263; 1908.
⁶) Dunstan u. Henry, Proc. Roy. Soc. 72, 287; 1903.

koeffizienten 1. Ordnung, $k = {}^1/_t \log a/a-x$, können also hier nicht gemessen werden.

Willstätter und Csányi[1]) bestimmen für ihre Präparate den „Zeitwert", d. h. sie messen die Zeit, welche zur 50%igen Spaltung von 0,10 g Amygdalin (20 ccm Lösung; 1 mg Emulsin; 30°) erforderlich ist. Aus den jeweils beobachteten Spaltungsgraden ermitteln sie durch die in Fig. 36 S. 247 mitgeteilte Kurve die der 50%igen Spaltung entsprechenden Zeiten. (Dabei ist die Abspaltung von 2 Mol. Glukose als theoretischer Wert angenommen.)

Zur Bestimmung der Enzymausbeute wenden die genannten Forscher einen Menge-Zeit-Quotienten an, der Enzymmenge proportional, additiv, nämlich den Quotienten des emulsinhaltigen Materials in mg und seiner Wirkungszeit. Z. B. lieferten 20 g Mandeln vom Zeitwert 480 (M:Z = 41,7) 0,55 g Enzympräparat (Emulsin) vom Zeitwert 18 (M:Z = 30,6); Ausbeute 73,5 %.

Zur Bestimmung der Bildung und Spaltung des Benzoxynitrils kann die Blausäure nach Volhardt durch eine Silberlösung titrimetisch bestimmt werden.

[1]) Willstätter u. Csányi, H. 117, 172 und zwar 176; 1921.

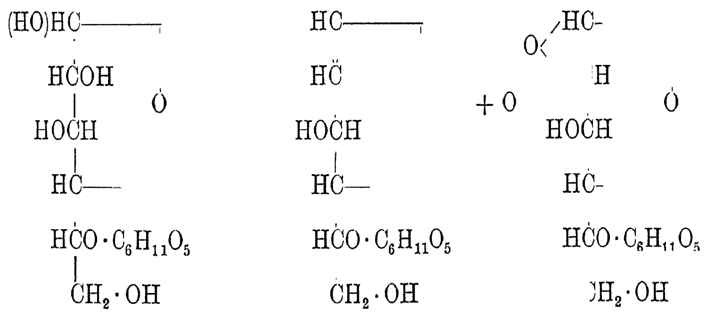
Kapitel 8.

Glukosido-β-Glukosidasen.

Die in diesem Kapitel behandelten Biosen werden von Mandelemulsin gespalten. Das deutet im allgemeinen auf die Zugehörigkeit zu den β-Glukosiden. Ein sicheres Kriterium ist dieses Verhalten zu Emulsin aber, wie schon Fischer hervorhob, nicht. Auch die Spezifität der Glukosido-β-Glukosidasen steht noch nicht fest.

A. Cellobiase.

Substrat: Die Cellobiose (Cellose) ist 1901 von H. Skraup und J. König[1]) dargestellt worden. Mikrokristallinisch, Schmp. 225°. $[\alpha]_D^{19,5} = +33,87^0$ (für c = 10)[2]). $[\alpha]_D^{16,5} = +33,5^0$ (für c = 1,05)[3]). Reduktionsvermögen nach Bertrand: 1,38 mg Cu per mg Cellobiose. Die Konstitution ist 1921 durch die Untersuchungen von Haworth[4]), Bergmann[5]) und Karrer[6]) und ihrer Mitarbeiter im wesentlichen aufgeklärt worden. Da die Kenntnis der Konstitution und Konfiguration für die weitere Erforschung der hierher gehörenden Enzymwirkungen grundlegend ist, teilen wir die hier in Betracht kommenden Formeln mit, und zwar sowohl diejenige der Cellobiose als des Cellobials und der daraus entstehenden 5-Glukosidomannose (Bergmann u. Schotte, l c. 1567).



Cellobiose = 5-Glukosido-glukose Cellobial 5 Glukosido-1.2-Anhydromannose

[1]) Skraup u. König, Chem. Ber. 34, 1115; 1901. — Siehe auch Maquenne und Goodwin, Bull. Soc. Chim. Paris (3) 31, 854; 1903.

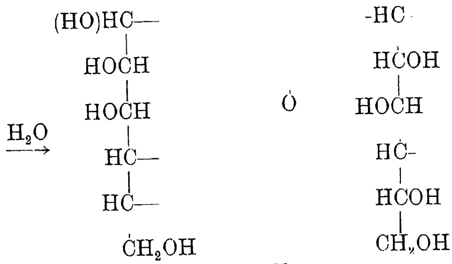
[2]) Bertrand u. Holderer, Bull. Soc. Chim. France (4) 7, 177; 1910.

[3]) Willstätter u. Zechmeister, Chem. Ber. 46, 2401, und zwar 2408; 1913.

[4]) Haworth und Hirst, Jl Chem. Soc. 119, 193; 1921.

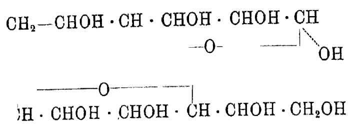
[5]) Bergmann u. Schotte, Chem. Ber. 54, 440 u. 1564; 1921. — Bergmann, Naturwiss. 9, 308; 1921.

[6]) Karrer u. Widmer, Helv. 4, 263, 295; 1921.

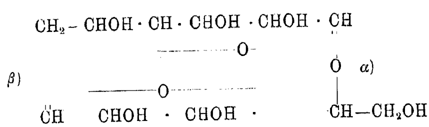


5-Glukosido-Mannose.

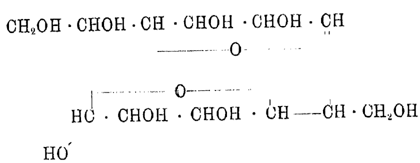
Im Anschluss an diese Formeln seien noch die von Karrer[1]) hervorgehobenen nahen Beziehungen erwähnt, welche zwischen dem Anhydrozucker Cellosan und einerseits der Cellobiose, andererseits der Maltose (oder Isomaltose) bestehen.



Maltose.



Cellosan.



Cellobiose.

Je nachdem, an welcher der beiden glukosidischen Bindungen die Spaltung erfolgt, muss sich aus Cellosan Cellobiose oder Maltose (bzw. Isomaltose) bilden können.

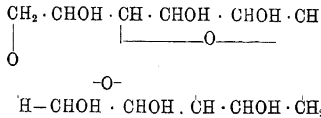
Dabei ist allerdings zu bemerken, dass man bisher Maltose bei der Hydrolyse der Cellulose nicht hat erhalten können; Karrer führt dies auf die Säureempfindlichkeit der Maltose zurück. Andererseits haben sich nur 50—60% Cellobiose in der Cellulose nachweisen lassen[2]). Immerhin bleibt dann noch aufzuklären, ob und wann der Cellosanring, der eine α- und eine β-Bindung enthalten soll, von α-Enzymen angegriffen wird. Auch über die evtl. Abspaltung von Cellobiose aus Stärke liegen noch keine Anhaltspunkte vor. Mit Mandelemulsin konnte im hiesigen Laboratorium in keinem Stadium des Stärkeabbaues eine Bildung von Cellobiose erzielt werden[3]).

[1]) Karrer u. Smirnoff, Helv. 5, 187; 1922.

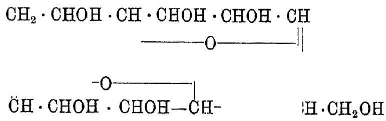
[2]) Karrer u. Widmer, Helv. 4, 174; 1921. — Freudenberg, Chem. Ber. 54, 767; 1921.

[3]) Siehe hierzu auch v. Friedrichs, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 5, Nr. 2—4; 1913.

Den Zusammenhang zwischen Diamylose und Cellosan stellt Karrer nunmehr durch folgende Formelbilder dar:



Diamylose.

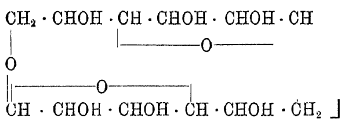


Cellosan.

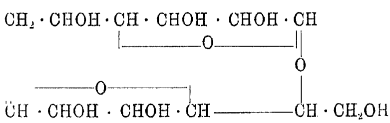
Die Formel der Diamylose (vgl. auch S. 84; S. 85 ist eine ältere Formel von Pringsheim angegeben) zeigt, warum aus dieser Biose und aus Stärke 100 % Maltose erhalten werden können; an welcher der beiden glukosidischen Bindungen nämlich auch Spaltung vor sich geht, es muss in beiden Fällen Maltose entstehen.

H. Pringsheim[1]) hat zuerst die Vermutung ausgesprochen, dass Cellulose polymere Anhydrocellobiose ist, eine Ansicht, welche auch Karrer[2]) vertritt.

Die Formeln der Stärke und der Cellulose schreibt also Karrer jetzt, ohne Berücksichtigung der Konfiguration, in folgender Art:



Stärke



Cellulose

Karrer u. Smirnoff betonen, dass man hier „einem ungemein klaren und in seiner Einfachheit wunderbaren Prinzip der pflanzlichen Kohlenhydratsynthese gegenübersteht".

„Der Grundkörper der Stärke (und des Glykogens) und der Cellulose ist die Maltose. Durch Anhydrisierung zwischen den Hydroxylen 1 und 12 der Maltosemolekel wird die Diamylose, der Grundkörper der Stärke, gebildet; durch Anhydrisierung zwischen den OH-Gruppen 1 und 11 bildet sich das Cellosan, das Grundglied der Cellulose. Ein polymerer Zustand der Diamylose ist die Stärke, eine polymere Form des Cellosans die Cellulose. Wie

[1]) H. Pringsheim, Cellulosechemie 2, 57; 1921.

[2]) Karrer, Cellulosechemie 2, 125; 1921.

durch eine einfache Umstellung von einzelnen Aminosäuren in den Eiweissmolekeln vom Organismus Eiweissstoffe erzeugt werden, die dem Angriff der Fermente nicht mehr unterliegen, so dass sie als Gerüst-Eiweissstoffe Verwendung finden können, so liegt es im Ermessen der Pflanze, durch anders verlaufende Anhydrisierung der Maltose statt Reservestoffe (Stärke, Glykogen) Gerüstsubstanz, Cellulose, zu erzeugen." — Dass in dieser Darstellung indessen noch manches Hypothetisch eenthalten ist, hat neuerdings Pringsheim hervorgehoben [1]).

Vorkommen der Cellobiase [2]). Die Cellobiose wird durch einen Bestandteil des Mandelemulsins gespalten. Bertrand gibt ferner andere Fruchtkerne (Aprikosen) und Getreidekörner als Fundorte einer Cellobiase an. Bertrand und Holderer [3]) sowie E. Fischer und Zemplén [4]) haben ein diese Biose angreifendes Enzym in Aspergillus niger und in Kefirkörnern festgestellt. In Russula hat sie Bertrand nicht gefunden. Bezüglich des Vorkommens in niederen Pilzen sei noch besonders auf die Arbeiten von H. Pringsheim und Zemplén [5]) verwiesen, welche mit Presssäften von Aspergillus Wentii (besonders enzymreich), Allescheria Gayonii, Penicillium purpurogenum, Mucor mucedo reichliche Spaltung von Cellobiose erzielten (siehe Tab., l. c. S. 382). Später hat H. Pringsheim [6]) die Wirkung einer Cellobiase in denitrifizierenden Bakterien, in Wasserstoffgärungsbakterien und in thermophilen Bakterien nachgewiesen.

Über die Besonderheit der Cellobiase und ihre Abgrenzung und Unterscheidung von Alkyl- und Phenyl-Glukosidasen und anderen Enzymen besitzen wir noch nicht genug experimentelle Unterlagen. Bertrand hat sich mit Holderer (Bull. 7, l. c.) sowie mit Compton [7]) auf Grund eigener Versuche nachdrücklich für die Existenz einer spezifischen Cellobiase ausgesprochen; die Vergleiche betreffen Laktase und Emulsin, und man wird den genannten Forschern bezüglich der Verschiedenheit der Cellobiase von Laktase zustimmen können; bezgl. Emulsin ist die Entscheidung wegen der zahlreichen Komponenten schwieriger.

Sichergestellt ist, dass Cellobiose durch Hefenenzyme nicht angegriffen wird, also kann die Cellobiase weder mit Maltase noch mit Trehalase, noch mit Amygdalase identisch sein.

Darstellung. Aus Aspergillus niger: Der Pilz wurde auf einer Asparagin-haltigen Nährlösung gezüchtet, dann nach der Vorschrift von Bour-

---

1) Pringsheim, Zs angew. Chem. 35, 345; 1922.

2) Was das Vorkommen in tierischen Organen und Sekreten betrifft, wie Pankreas, Darm, Pferdeserum (Porcher, Soc. Biol. 68) so bleibt noch zu untersuchen, inwieweit Bakterien oder Leukozyten an den beobachteten Cellobiosespaltungen beteiligt sind.

3) Bertrand u. Holderer, C. r. 149, 1385; 1909. — 150, 230; 1910. — Siehe auch Holderer, Woch. f. Brau. 26, 380; 1909.

4) Fischer u. Zemplén, Lieb. Ann. 365, 1; 1909. — 372, 254; 1910.

5) H. Pringsheim u. Zemplén, H. 62, 367; 1909.

6) H. Pringsheim, H. 78, 266; 1912.

7) Bertrand u. Compton, C. r. 151, 402; 1910. — Ann. Inst. Pasteur, 24, 931; 1910.

quelot[1]) getrocknet. Hierauf wurden 2 g des zerriebenen Materials mit 20 ccm Wasser 24 Stunden bei 37° ausgelaugt. Mit 10 ccm dieser Lösung wurden 0,5 g Cellobiose unter Zusatz von Toluol 84 Stunden bei 37° stehen gelassen, dann war die Biose zum grössten Teil gespalten.

Aus Kefirkörnern: 25 g gewaschene Kefirkörner werden mit 150 ccm dest. Wassers und 2,5 ccm Toluol bei 20°—23° während 48 Stunden unter zeitweisem Umschütteln stehen gelassen. Die Hydrolyse der Cellobiose erfolgt nur langsam.

Aus niedrigen Pilzen durch Presssäfte: Pringsheim und Zemplén, l. c.

Wirkungsbedingungen. Aus Bertrands und Comptons[2]) Angaben lässt sich entnehmen, dass das Aziditätsoptimum bei etwa pH = 6 liegt.

Für Extraktion und Filtration durch Ton soll nach Bertrand und Holderer (Bull. Soc. Chim. (4) 7, 180 u. ff.) die Azidität sehr wesentlich sein. Natürlich sind hier wie bei der Saccharase die Verunreinigungen ausschlag-

Einfluss der Temperatur: Auch bezüglich der Temperatur liegt eine Untersuchung von Bertrand und Compton[3]) vor, welche mit Extrakt aus süssen Mandeln angestellt ist; die von ihnen angegebenen Kurven zeigen ein deutliches Maximum der Wirksamkeit bei etwa 46°.

3 Minuten langes Erhitzen auf 75°—77° hat das Enzym zerstört. Bereits bei 67° ist die Bakterien-Cellobiase genügend schnell inaktiviert, um den enzymatischen Abbau durch gewisse Bakterien so leiten zu können, dass die Cellulase (welche Cellobiose bildet) noch wirksam bleibt, während ein weiterer Abbau der entstandenen Biose verhindert wird. Dadurch ist es H. Pringsheim gelungen, wichtige Aufklärungen über die Cellulosespaltung zu erhalten (vgl. S. 67).

Synthese. Wie schon im I. Teil erwähnt, hat Bourquelot zusammen mit Bridel und Aubry mit Hilfe von Emulsin Glukose zu Cellobiose synthetisieren können. Gleichzeitig wird Gentiobiose gebildet. Beim ersten Versuch[4]) wurde Glykol als Lösungsmittel verwendet; dabei entstand ausserdem noch Glykolmonoglukosid und Glykoldiglukosid. Bei weiteren Versuchen in wässriger Lösung[5]) war der Nachweis der Cellobiose neben Gentiobiose weniger scharf.

Cellobioson.

Bemerkenswert ist, dass auch das Cellobioson durch Emulsin gespalten wird. E. Fischer und Zemplén[6]), welche diesen Körper dargestellt haben, geben darüber folgenden Versuch an:

---

[1]) Bourquelot, C. r. 116, 826; 1893.
[2]) Bertrand und Compton, C. r. 153, 360; 1911.
[3]) Bertrand und Compton, Bull. Soc. Chim. France (4) 9, 100; 1911.
[4]) Bourquelot und Bridel, C. r. 168, 1016; 1919.
[5]) Bourquelot, Bridel und Aubry, Jl de Pharm et de Chim. (7) 21, 129; 1920.
[6]) E. Fischer und Zemplén, Lieb. Ann. 365, 1; 1909.

Eine Lösung von 1 g Cellobiose in 8 ccm Wasser blieb mit 0,5 g Emulsin 20 Stunden bei 36⁰ stehen. Nach dem Aufkochen mit wenig Na Ac wurde filtriert. Die Flüssigkeit enthielt jetzt Glukoson und Traubenzucker, denn sie gab in der Kälte auf Zusatz von salzsaurem Phenylhydrazin und Na Ac sehr bald einen reichlichen Niederschlag von Phenylgukosazon.

Hydrocellobial.

Das Hydrocellobial, $C_{12}H_{22}O_9$ haben E. Fischer und K. v. Fodor[1]) aus Hexa-acetylcellobial durch Reduktion mit Platinmohr nach Willstätter und Abspaltung der Azetylgruppen mittels Baryt erhalten. „Die nahen Beziehungen zum Glucal und Hydroglucal liessen sich beweisen durch die Hydrolyse des Hydrocellobials mit Emulsin."

$$\overbrace{(HO)CH_2\cdot CH\cdot CH_2\cdot CH(OH)\cdot C}^{O}:CH(OH)$$

Glucal.

$$\overbrace{(HO)CH_2\cdot CH\cdot CH_2\cdot CH(OH)\cdot CH}^{O}\cdot CH_2(OH)$$

Hydroglucal.

„Eine Lösung von 2 g Hydrocellobial in 20 ccm Wasser blieb mit 0,8 g käuflichem Emulsin und einigen Tropfen Toluol in verschlossenem Gefäss 2 Tage bei 37⁰ und wurde dann filtriert, aufgekocht, abermals filtriert und nochmals gekocht. Um die jetzt in der Lösung in reichlicher Menge enthaltene Glukose zu entfernen, haben wir mit 0,5 g obergäriger Hefe versetzt und unter den üblichen Vorsichtsmassregeln wieder 24 Stunden bei 37⁰ gehalten. Die von der Hefe abfiltrierte Lösung, welche jetzt kaum noch reduzierte, wurde unter vermindertem Druck verdampft, der Rückstand mit Alkohol ausgekocht, das alkoholische Filtrat wieder verdampft und der Rückstand mehrmals mit Essigäther ausgekocht. Beim Verdampfen des Essigäthers blieb ein Sirup. Er wurde in sehr wenig Alkohol gelöst, bis zur beginnenden Trübung mit Petroläther versetzt und mit einem Kriställchen von Hydroglucal geimpft. Alsbald begann die Abscheidung von schön ausgebildeten Prismen." Dieselben schmelzen bei 85—87⁰ und gleichen in jeder Beziehung dem Hydroglucal, $C_6H_{12}O_4$.

Über die Rolle von Glucal und Hydroglucal im pflanzlichen Organismus ist bis jetzt nichts bekannt. Eine nähere Untersuchung verdienen die enzymatische Aufspaltung und Bildung des γ- und δ-Laktonringes und des Pyronringes und die Übergänge, welche dadurch zwischen Abkömmlingen der Zuckergruppe und des Pyrons ermöglicht werden; besonders ist die Bildung des Maltols, $C_6H_6O_3$ (Peratoner; Traetta-Mosca[2]), hierbei in Betracht zu ziehen und mit derjenigen des Hydroglucals zu vergleichen.

B. Gentiobiase.

Substrat. Die von Bourquelot und Hérissey[3]) 1901 entdeckte Gentiobiose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, schmilzt bei 190—195⁰. Mutarotiert; $[\alpha]_D$ der α-Form $= +39^0$; der β-Form $= -11^0$; im Gleichgewicht ist $[\alpha]_D = -9{,}6^0$.

[1]) E. Fischer und K. v. Fodor, Chem. Ber. 47, 2057; 1914.

[2]) Traetta-Mosca, R. Acad. du Lincei 30, 324; 1921.

[3]) Bourquelot und Hérissey, C. r. 132, 571; 1900. — 135, 290, 399; 1901. — Jl de Pharm. et de Chim. (6) 16, 420; 1901.

Der Gentiobioserest ist in der Gentianose enthalten (vgl. S. 208). Zemplén[1]) hat das gut kristallisierende Octoacetat der Gentiobiose direkt aus dem Extrakt der Enzianwurzel, Radix gentianae german.[2]) gewonnen. Von Hefen wird Gentiobiose im allgemeinen nicht hydrolysiert; nur bei einer Unterhefe fanden Bourquelot und Hérissey[3]) eine schwache Spaltungsfähigkeit.

Als weiteres Substrat des gleichen Enzyms kommt auch die Gentianose selbst in Betracht, und zwar würde die Spaltung durch die Gentiobiase zwischen den beiden Glukoseresten eintreten müssen, wobei Rohrzucker entsteht:

Fruktose—Glukose—⋮—Glukose.

Bourquelot und Bridel[4]) haben auf diese Weise Gentianose durch saccharasefreies Emulsin spalten und Glukose sowie Rohrzucker isolieren können. Wie aber Bourquelot schon viel früher[5]) fand, spaltet das gleiche Emulsin die Gentianose selbst viel langsamer als die freie Gentiobiose.

Verbreitung, Wirkungsweise und Eigenart des Enzyms sind noch wenig untersucht. Nur dass es zu den β-Enzymen gehört, dürfte mit Sicherheit behauptet werden können.

Synthetische Wirkung. Bourquelot, Hérissey und Coirre[6]) ist es 1913 gelungen, die Synthese der Gentiobiose aus Glukose mittels Emulsin durchzuführen und diese Synthese, welche in der Geschichte der enzymatischen Synthesen einen hervorragenden Platz einnimmt, ist später von Zemplén (Chem. Ber. 48, l. c.) durchaus bestätigt worden[7]).

Die genannten Forscher beschreiben folgenden Versuch:

1000 ccm einer Lösung von 50 g Glukose in 100 ccm ($\alpha = +50^0\ 30'$, $l = 2$) wurden mit 5 g Emulsin und 5 g Toluol versetzt, hierauf bei 15—20° während eines Monats täglich 2–3 mal umgeschüttelt. Die Drehung fiel auf $+44^0\ 12'$.

Hierauf wurde die Lösung erhitzt, filtriert und einer Gärung durch obergärige Bierhefe unterworfen. Die gegorene, mittels $CaCO_3$ neutralisierte Lösung wurde unter vermindertem Druck ganz eingedampft. Der Rückstand wurde 3 mal mit 95%igem Alkohol und 3 mal mit 90%igem Alkohol (jedesmal mit 150 ccm) unter Rückfluss ausgekocht. Die nach Erkalten filtrierten Extrakte wurden mit Gentiobiose-Kristallen geimpft. Nach etwa 3 Wochen wurden die Flüssigkeiten dekantiert, von kristallisierten aschereichen Produkten abfiltriert und wieder mit Gentianose geimpft. Nach 6 Wochen wurden die aufs neue entstandenen Kristalle (etwa 8 g) gesammelt und aus 90%igem Alkohol umkristallisiert; sie erwiesen sich als Gentiobiose.

[1]) Zemplén, H. 85, 399; 1913. — Chem. Ber. 48, 233; 1915.

[2]) Gentianose kommt (neben Rohrzucker) auch in anderen Gentiana-Arten (cruciata u. purpurea) vor (Bridel, Soc. Biol. 83, 24; 1920).

[3]) Bourquelot und Hérissey, Ann. Chim. et Phys. (7) 26; 1902.

[4]) Bourquelot und Bridel, C. r. 171, 11; 1920. — Jl de Pharm. et de Chim. (7) 22, 241; 1920.

[5]) Bourquelot, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 16; 15. Dez. 1902.

[6]) Bourquelot, Hérissey und Coirre, C. r. 157, 732; 1913. — Jl de Pharm. et de Chim. (7) 8, 441; 1913.

[7]) Siehe auch Bourquelot und Bridel, C. r. 165, 728; 1917 und 168, 253; 1919 (Glykol als Lösungsmittel).

Wie diese Synthese (und diejenigen der Alkylglukoside) zeigt, lässt sich die früher von Armstrong geäusserte Auffassung, dass die Enzyme diejenigen Stoffe bilden, zu deren Spaltung sie unfähig sind, nicht mehr aufrecht erhalten, vielmehr deuten alle sicheren Tatsachen darauf hin, dass die Enzyme von beiden Seiten her Gleichgewichte einzustellen vermögen. Bei den Biosen ist man leider über die Lage der Gleichgewichte (die sich ohne Enzym einstellen würden) nicht genügend unterrichtet (vgl. auch I. Teil S. 220 ff.).

C. Spaltung der Isomaltose.

E. Fischer[1]) erhielt bei der Einwirkung von konz. Salzsäure auf Glukose (100 g Glukose + 400 g rauch. HCl, 15 St. bei 15°) eine Biose, welche er als Isomaltose bezeichnete. Harrison[2]) fand für Isomaltose, die durch 0,7 n. HCl synthetisiert war $[\alpha]_D = +84{,}4^0$.

Das Vorkommen der Isomaltose im tierischen und pflanzlichen Organismus ist von manchen Forschern (Pavy, Röhmann) behauptet, von anderen bestritten worden. Auch über die enzymatische Bildung der Isomaltose aus Stärke gehen die Ansichten auseinander[3]).

Durch Maltase wird Isomaltose nicht gespalten. E. F. Armstrong[4]) fand, dass Isomaltose durch Emulsin hydrolisiert wird. Damit wäre nach unseren gegenwärtigen Ansichten die Tatsache vereinbar, dass die von Croft Hill[5]) durch enzymatische Synthese erhaltene Biose Isomaltose[6]) war. Obwohl Croft Hill zu seiner Synthese Bierhefe angewandt hatte, kann sich Isomaltose gebildet haben, da, wie Henry und Auld[7]) und später Neuberg nachweisen konnten, Bierhefe auch etwas „Emulsin“ (β-Glukosidase) enthält; Bayliss hat sich schon zeitig in dieser Richtung ausgesprochen.

Da nun Bourquelot, Hérissey und Coirre die Synthese der Gentiobiose unzweifelhaft gelungen ist (vgl. S. 275), so liegt die Annahme nahe, dass Gentiobiose und Isomaltose identisch sind. Dies ist aber, wie ein bemerkenswerter Versuch von Zemplén[8]) gezeigt hat, nicht der Fall. Isomaltose ist also eine besondere Glukosido-β-Glukose.

---

[1]) E. Fischer, Chem. Ber. 23, 3687; 1890. — 28, 3024; 1895.

[2]) Harrison, Jl Amer. Chem. Soc. 36, 586; 1914.

[3]) Durch die neueren Ergebnisse über die Konstitution der Stärke (vgl. die Stärkeformel von Karrer, S. 271) und durch die Annahme, dass in dieser Ringformel eine α- und eine β Glukosidbindung vorkommt, wäre die Bildung von Isomaltose aus Stärke theoretisch verständlich.

[4]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B. 76, 592; 1905.

[5]) Croft Hill, Jl Chem. Soc. 73, 634; 1898.

[6]) Emmerling, Chem. Ber. 34, 600 und 3810; 1901.

[7]) Henry und Auld, Proc. Roy. Soc. B. 76, 568; 1905.

[8]) Zemplén, Chem. Ber. 48, 233; 1915.

Kapitel 9.

Verhalten der Methyl-Fruktoside und -Sorboside, der Heptoside, Pentoside und Maltoside gegen Emulsin.

Die Zusammenfassung der in der Überschrift genannten Stoffe in einem besonderen Kapitel geschieht lediglich der Übersichtlichkeit wegen und aus systematischen Gründen; es soll damit nicht die Vermutung ausgesprochen werden, dass ihre Spaltungen von einem spezifischen Enzym oder einer spezifischen Enzymgruppe beschleunigt werden. Vielmehr muss man es sogar als wahrscheinlich betrachten, dass die angreifbaren Rhamnoside und β-Bioside — mit der einen oder anderen Ausnahme — ihre Spaltung und Bildung durch die entsprechenden β-Glukosidasen erfahren. Im Interesse einer kommenden Durcharbeitung der hierher gehörenden Enzymwirkungen habe ich geglaubt, wenigstens die typischen Substrate, die auf ihre enzymatische Spaltbarkeit geprüft worden sind, hier zusammenstellen zu sollen, um so mehr, als hierdurch Material gesammelt wird zur Beantwortung der Frage, welche Konstitutionseinflüsse sich bei enzymatischen Hydrolysen geltend machen.

Da über die Enzyme selbst nichts Näheres bekannt ist, so betrifft die folgende Zusammenstellung die Substrate.

A. Hexoside.

Methyl-l-Glukoside.

(E. Fischer, Chem. Ber. 28.) Sowohl die α- als die β-Form ist dargestellt. Sie werden weder von Emulsin noch von Hefeninfus angegriffen.

Methyl-Mannoside.

Methyl-d-Mannosid und Methyl-l-Mannosid (E. Fischer, Chem. Ber. 26) wird nach der verbesserten Fischerschen Methode (sehr verdünnte methylalk. Salzsäure) dargestellt[1]). In 8%iger wässeriger Lösung wurde $[\alpha]_D^{20} = +79{,}2^0$ bzw. $-79{,}4^0$ gefunden. Van Ekenstein nimmt an, dass hier α-Verbindungen vorliegen.

Die enzymatische Spaltung der verschiedenen Isomeren ist noch nicht hinreichend aufgeklärt. Wie Fischer (Chem. Ber. 28, 1430) schreibt, wäre es sehr erwünscht, dass noch das zweite Methyl-d-Mannosid aufgefunden würde, vielleicht ist dasselbe im Gegensatz zu der schon bekannten Verbindung durch Emulsin leicht spaltbar.

Über enzymatische Bildung eines α-Methyl-d-Mannosides siehe Hérissey, C. r. 172.

---

[1]) E. Fischer u. Beensch, Chem. Ber. 29, 2927; 1896. — Siehe auch Lobry de Bruyn und van Ekenstein, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. 15, 223; 1896.

β-Methyl-Fruktosid.

Das aus einer Lösung von Fruktose in abs. Methylalkohol, der 0,5% HCl enthält, entstehende Methylfruktosid[1]) konnte von E. Fischer nicht kristallisiert erhalten werden. Es wird von verdünnten Säuren überaus leicht in Fruktose zurückverwandelt; „dieselbe Spaltung erfährt es partiell durch Hefeinfus". Es dürfte überwiegend die α-Verbindung enthalten haben. Erst Hudson und Brauns[2]) ist die Darstellung des kristallisierten β-Methyl-Fruktosides gelungen. Schmelzpunkt 119—120°. $[\alpha]_D^{20} = -172{,}1^0$ (p = 10). Emulsin hydrolysiert das Glukosid nach Hudson nicht (auch nicht Hefeenzym). In Rücksicht auf das von β-Methylglukosid etwas abweichende Verhalten und auf eine Verschiedenheit bezüglich des Laktonringes wäre eine eingehende Untersuchung der Einwirkung von Enzymen erwünscht.

Methyl-Sorboside.

Von E. Fischer wurde ein Methylsorbosid aus abs. methylalkoholischer Lösung durch 1% HCl dargestellt. $[\alpha]_D^{20} = -88{,}9^0$. Der Sorbose kommt die untenstehende Konstitutionsformel zu, und zwar betrachtet Hudson die von Fischer gewonnene Verbindung als der l-Reihe zugehörig; sie ist als α-Methyl-l-Sorbosid zu bezeichnen. Die Verbindung wird weder von Hefeninfus noch von Emulsin gespalten.

CH_2OH
|
CO
|
HOC·H
|
HCOH
|
HOCH
|
CH_2OH

Die von Lobry de Bruyn und A. van Ekenstein dargestellte Verbindung, $[\alpha]_D = +88{,}5^0$, ist demgemäss als Methyl-d-Sorbosid anzusehen.

α-Methyl-Glukoheptosid.

Wird weder von Hefenenzymen noch von Emulsin angegriffen[3]).

B. Pentoside und Methylpentoside.

l-Arabinoside.

Der (natürlich vorkommenden) l-Arabinose wird die untenstehende Konfigurationsformel zugeteilt. Von den nach der Fischerschen Methode daraus

[1]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1160; 1895.
[2]) Hudson und Brauns, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1216; 1916.
[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1156; 1895.

hergestellten Methyl-Arabinosiden wird die von Fischer isolierte α-Verbindung[1]) weder durch Hefenenzyme noch durch Emulsin gespalten.

```
   HCO
    |
   HCOH
    |
 HOCH
    |
 HOCH
    |
    CH2OH
```

Ebensowenig wird das entsprechende Aethyl- und Benzyl-Derivat von diesen Enzymen angegriffen.

Purdie und Rose[2]) haben das β-Methyl-l-Arabinosid kristallisiert erhalten.

l-Xyloside.

Die Konfigurationsbezeichnung ist hier einigermassen willkürlich[3]).

β-Methyl-l-Xylosid[4]). Schmelzpunkt 155—156°. $[\alpha]_D^{20} = -65{,}9^0$. Wird von Emulsin nicht gespalten (auch nicht von Hefenenzym) (Chem. Ber. 28, 1430).

α-Methyl-l-Xylosid[4]). Schmelzpunkt 90—92°. $[\alpha]_D^{20} = +153{,}2^0$. Wird weder von Hefenenzymen noch von Emulsin gespalten.

```
   HCO
    |
   HCOH
    |
 HOCH
    |
   HCOH
    |
    CH2OH
```

Im allgemeinen scheinen Pentoside von Emulsin überhaupt nicht angegriffen zu werden[5]).

Gentiin.

Dieses von Tanret[6]) aus der Wurzel von Gentiana lutea gewonnene Glukosid — das einzige bekannte, welches Xylose enthält — wird durch verdünnte Säuren nach der Formel zerlegt:

$$\underset{\text{Gentiin}}{C_{25}H_{28}O_{14}} + 2\,H_2O = \underset{\text{Glukose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Xylose}}{C_5H_{10}O_5} + \underset{\text{Gentianin}}{C_{14}H_{10}O_5}.$$

Die enzymatischen Spaltungen sind noch nicht aufgeklärt.

[1]) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 2985; 1894.

[2]) Purdie und Rose, Jl Chem. Soc. 89, 1204; 1906.

[3]) Siehe hierzu E. Fischer, Chem. Ber. 40, 103; 1907.

[4]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1145; 1895.

[5]) Siehe auch Ryan und Ebrill, Proc. Irish Acad. 26, 5, 53; 1906. Ferner Levene u. Jacobs, Jl Biol. Chem. 11, 371; 1912.

[6]) Tanret, Bull. Soc. Chim. Paris (3) 33, 1073; 1905.

Apiin.

Das Petersilien-Glukosid Apiin[1]) enthält die Aldopentose Apiose

$$OCH \cdot CH(OH) \cdot C(OH)\left\langle\begin{matrix} CH_2OH \\ CH_2OH \end{matrix}\right.$$

neben d-Glukose und Apigenin (1, 3, 3′ Trioxyflavon). Hydrolyse mit verdünnten Säuren liefert Glukoapigenin und Apiose. Apiose dürfte also an die Glukose zu einem Bioserest gebunden sein.

Apiin wird weder von Mandelemulsin noch von Aspergillusextrakt zerlegt. Vermutlich sind zur vollständigen Spaltung 2 Enzyme, eine Apiinase und eine Glukoapigeninase, erforderlich; ihre Existenz ist noch nicht erwiesen.

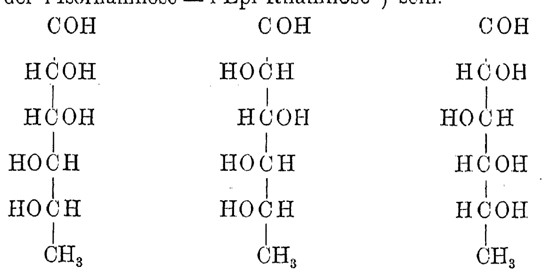
Riboside.

Hierher sind die Riboside der Purin- und Pyrmidinbasen zu zählen, welche ihr Entdecker Levene[2]) als Nukleoside zusammenfasst, und wenn man die Systematik der Substrate ausschliesslich massgebend sein liesse, so wären die Enzyme der Nukleoside in diesem Abschnitt zu behandeln. Da indessen die Wirksamkeit und Rolle dieser Nukleosidasen in engerem Zusammenhang mit den übrigen Enzymen der Nukleoproteide und Nukleinsäuren steht, so sollen sie auch mit diesen in der zweiten Hälfte dieses Buches beschrieben werden.

Rhamnoside.

Die natürlich vorkommende Rhamnose (siehe untenstehende Formel), $[\alpha]_D^{20} = +8{,}9^0$ nach Hudson[3]), wird als l-Rhamnose angesehen[4]). Aus der natürlichen Rhamnose hat E. Fischer[5]) ein Methylrhamnosid dargestellt, welches weder durch Emulsin noch durch Hefenenzym spaltbar ist[6]).

Ebenfalls durch Emulsin unangreifbar dürfte die entsprechende Methylverbindung der l-Isorhamnose = l-Epi-Rhamnose[7]) sein.

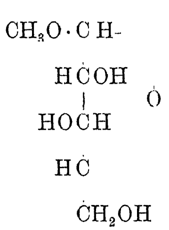


l-Rhamnose (Isodulcit) — l-Epi-Rhamnose (l-Iso-Rhamnose) — d-Epi-Rhamnose (Iso-Rhodeose)

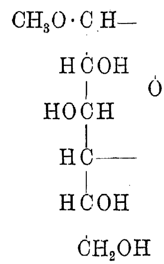
[1]) Vongerichten, Lieb. Ann. 318, 121; 1901 und 321, 71; 1902.
[2]) Levene und Medigreceann, Jl Biol. Chem. 9, 65; 1911.
[3]) Hudson, Jl Amer. Chem. Soc. 39, 1013; 1917.
[4]) Votoček, Chem. Ber. 44, 821 und 824; 1911.
[5]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1158; 1895.
[6]) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 2985; 1894 und H. 26, 60; 1898.
[7]) E. Fischer und Herborn, Chem. Ber. 29, 1961; 1896.

Dagegen hat Fischer gezeigt, dass das β-Methyl-Derivat ihrer optischen Antipode, die d-Epi-Rhamnose durch Emulsin leicht spaltbar ist[1]. „Für den Angriff des Enzyms ist also die endständige Alkoholgruppe des Traubenzuckers nicht nötig. Um so beachtenswerter erscheint nun das Verhalten der beiden Methylxyloside, welche aus Xylose durch alkoholische Salzsäure unter denselben Bedingungen gebildet werden wie α- und β-Methylglukosid am Traubenzucker.“ Aus der Ähnlichkeit der Bildungsweise und der Konfiguration der Xylose hat Fischer geschlossen, dass das d-Iso-Rhamnosid (d-Epi-Rhamnosid) in der Mitte zwischen den Xylosiden und den Methyl-d-Glukosiden steht. (Vgl. hierzu I. Teil, S. 247.)

Es erscheint lohnend, eine eingehende Untersuchung darüber anzustellen, ob tatsächlich allgemein die β-Methylglukoside der Zucker der d-Reihe von Mandelemulsin gespalten werden, während die Zucker der l-Reihe unangegriffen bleiben. Man könnte bis jetzt auf Grund der vorliegenden Angaben versucht sein, die obigen von Fischer hervorgehobenen Tatsachen darauf zurückzuführen, dass beide Xyloside der l-Reihe angehören, im Gegensatz zum d-Epi-Rhamnosid und dass ein Konfigurationsunterschied zwischen dem β-Methylxylosid und dem β-Methylglukosid besteht, welcher durch die nachstehenden Formeln nicht zum Ausdruck kommt:



Xylosid.



Glukosid.

Natürliche Rhamnoside. Rhamnose ist in zahlreichen natürlichen Glukosiden enthalten; und zwar teils als einzige Zuckerart (Quercitrin, Frangulin u. a.), teils zusammen mit Glukose (Hesperidin, Rutin u. a.), teils zusammen mit Galaktose (Xanthorhamnin). Die meisten natürlichen Rhamnoside sind Xanthon- und Flavonderivate. Ob dabei eigentliche Flavonrhamnoside vorliegen, oder ob die Rhamnose an die Hexose gebunden ist, steht in vielen Fällen noch nicht fest.

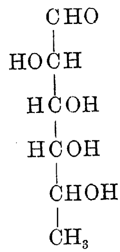
Mandelemulsin scheint gegenüber Rhamnosiden unwirksam zu sein, was bei den echten Flavon-Rhamnosiden und auch bezüglich der Spaltung zwischen Glukose und Rhamnose auf die Zugehörigkeit der Rhamnose zur l-Reihe zurückgeführt werden kann.

[1] E. Fischer und Zach, Chem. Ber. 45, 3761; 1912.

Schliesslich ist unter den Rhamnosiden auch das Trisaccharid Rhamninose, bestehend aus Glukose-Rhamnose-Rhamnose zu erwähnen. Auch hier ist über spezifische Enzyme nichts Genaues bekannt.

Fucoside.

Die Fucose, deren d-Form (die frühere Fucose) die untenstehende Konfiguration besitzt, kommt neben Arabinose bzw. Xylose in Tragantgummi vor, welcher zu seiner Spaltung ein besonderes Enzym (evtl. zwei solche) erfordert.



d-Fucose.

Die Rhodeose ist nach Votoček[1]) das Spiegelbild, also l-Fucose. Letztere ist in einigen natürlichen Glukosiden (Jalapin) gefunden worden. Über das entsprechende Enzym ist nichts bekannt.

C. Alkyl- und Phenyl-Bioside.

β-Maltoside.

Aus dem von Fischer und E. F. Armstrong[2]) dargestellten β-Methylmaltosid wird durch Emulsin Maltose freigemacht. Dagegen spaltet Hefenextrakt in Traubenzucker und β-Methylglukosid.

Ähnlich verhält sich β-Phenyl-Maltosid[3]), welches durch Emulsin ebenfalls in Maltose und Phenol verwandelt wird, und das gleiche gilt von einem Menthol-Maltosid.

1) Votoček, Chem. Ber. 43, 469; 1910.
2) E. Fischer und E. F. Armstrong, Chem. Ber. 34, 2896; 1901.
3) E. Fischer und Armstrong, Chem. Ber. 35, 3144; 1902.

Kapitel 10.

β-Galaktosidasen.

A. Alkyl-β-Galaktosidasen.

Sowohl α- als β-Methylgalaktosid ist von E. Fischer[1]) dargestellt worden.

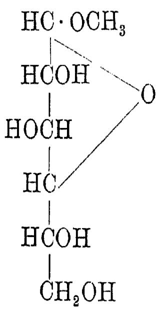
α-Methylgalaktosid, Schmelzpunkt 110°. $[\alpha]_D^{20°} = +179{,}3°$ (p = 9). Weder Enzyme tierischen Ursprungs[2]) noch Hefenenzyme noch Kefirenzyme[3]) spalten. Pottevin[4]) hat eine Einwirkung durch ein Enzym aus Aspergillus niger beobachtet und nach Bierry (C. r. 149) enthält Helix pomatia sowohl eine α- als eine β-Galaktosidase.

β-Methylgalaktosid[1])[5]), Schmelzpunkt 173—176°. Wässerige Lösung zeigt keine deutliche Drehung; in kalt ges. Boraxlösung (p = 8,5) $[\alpha]_D^{20°} = +2{,}6°$.

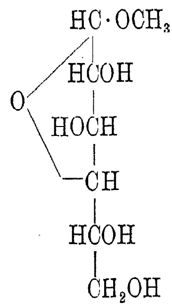
Für die Geschwindigkeit der Säurespaltung geben Armstrong und Caldwell folgende relative Zahlen an[6]):

α-Methylglukosid .	100
β-Methylglukosid .	179
α-Methylgalaktosid	542
β-Methylgalaktosid	884
Laktose	582.

Zur Beurteilung der Stellung der β-Methylgalaktosidase zur β-Methyl-Glukosidase seien hier die Formeln der beiden Substrate nebeneinandergestellt:



β-Methyl-Glukosid.



β-Methyl-Galaktosid.

[1]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1154; 1895. — Fischer und Beensch, Chem. Ber. 27, 2480; 1894.

[2]) E. Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. 5, 73; 1896.

[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 2985 und 3482; 1894.

[4]) Pottevin, Ann. Inst. Pasteur 17. 31; 1903.

[5]) Königs und Knorr, Chem. Ber. 34, 979; 1901.

[6]) Siehe auch E. F. Armstrong, The simple Carbohydrates, 3. Aufl. S. 130.

Die beiden Stoffe unterscheiden sich also nur durch die räumliche Lage des Laktonringes.

Die Spaltung durch (Mandel-)Emulsin hat E. Fischer 1895 gefunden[1]. „Der Versuch ist interessant genug, um ausführlich mitgeteilt zu werden. 1 Teil des Galaktosids wurde in 10 Teilen Wasser gelöst, mit 0,2 Teilen Emulsin versetzt und während 3 Tagen auf 33° erwärmt. Es waren dann 35% des Materials in Zucker verwandelt. Bei Anwendung der doppelten Menge Emulsin stieg die Spaltung auf 60%."

Wird ausserdem durch Kefirlaktase[2]) und durch ein Enzym aus Aspergillus niger gespalten, ferner wie oben erwähnt, durch ein Helix-Enzym[3]). Bierry hat übrigens an Helix-Material Beobachtungen gemacht, welche auf eine Verschiedenheit von β-Alkylgalaktosidasen und Laktase hindeuten können. Die Äthylgalaktoside verhalten sich analog mit den Methylverbindungen.

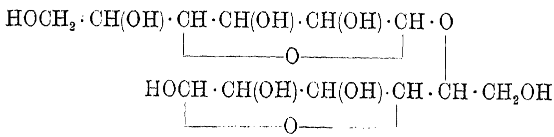
Das Gleichgewicht, welches unter Einwirkung von Emulsin zwischen Galaktose und Propylalkohol eintritt hat Bridel[4]) nach dem Massenwirkungsgesetz berechnet.

B. Laktase.

Substrat: Milchzucker; α-Modifikation (gewöhnlicher Milchzucker) $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$. Das Kristallwasser entweicht erst bei 125°. $[\alpha]_D^{20} = +90°$. Die Mutarotation ist eingehend von Hudson studiert[5]). α-Laktose ist = α-Glukose-β-Galaktosid.

β-Modifikation; $C_{12}H_{22}O_{11}$; Umwandlungstemperatur in α-Modifikation 92—93°. $[\alpha]_D^{20} = +35°$. β-Laktose ist β-Glukose-β-Galaktosid. $[\alpha]_D^{20}$ im Gleichgewicht wasserhaltig $= +52{,}5°$ nach v. Lippmann[6]).

Nach Haworth und Leitch[7]) ist die Bindung zwischen der Glukose und der Galaktose folgende:



Ferner ist zu erwähnen, dass es E. Fischer und Curme[8]) gelungen ist, das Hydrolaktal $C_{22}H_{22}O_9$ mittels Emulsin zu spalten. Der Nachweis der Spaltprodukte, Galaktose (als Schleimsäure) und Hydroglucal wurde in einwandfreier Weise geliefert.

Eine von Fischer und Armstrong (Chem. Ber. 35) vermittels Kefirkörnern synthetisch dargestellte Isolaktose ist noch nicht rein dargestellt.

[1]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1429; 1895.
[2]) E. Fischer und E. F. Armstrong, Chem. Ber. 35, 3155; 1902.
[3]) Bierry und Giaja, Soc. Biol. 61, 485; 1906.
[4]) Bridel, C. r. 172, 1288; 1921.
[5]) Hudson, Zs physik. Chem. 44, 487; 1903. — Jl Amer. Chem. Soc. 26, 1065; 1904.
[6]) v. Lippmann, Chemie der Zuckerarten, 3. Aufl., S. 1528.
[7]) Haworth und Leitch, Jl Chem. Soc. 113, 188; 1919.
[8]) E. Fischer und Curme, Chem. Ber. 47, 2047; 1914.

Durch den verdauenden Saft von Helix pomatia wird nach Bierry und Giaja[1]) auch die Laktobionsäure angegriffen; es entsteht Galaktose und Glukonsäure; der mazerierte Darm eines Kuh- oder Schaffötus zeigte diese Wirkung nicht oder nur in geringen Grad. Durch Helix-Saft soll sich auch das Laktosazon in Galaktose und Glukosazon zerlegen lassen[2]).

1. Tierische Laktasen.

Vorkommen: Im Darm junger Säugetiere[3]); der Einfluss des zugeführten Zuckers ist noch nicht endgültig festgestellt (siehe z. B. Strauss, Berl. Klin. Wochenschr. 1898). Demgemäss auch im Kot von Säuglingen (Langstein und Steinitz, 1906) und säugender Tiere (Porcher, 1900). Laktase tritt nach Porcher[4]) bei Katzen, Hunden, Kälbern (hier am 45. Tage) in der Darmschleimhaut schon während des fötalen Lebens auf, und nimmt mit dem Alter des Fötus zu. Bei älteren Tieren nimmt der Laktasegehalt im Darm ab oder verschwindet ganz, soll aber durch längere Milchfütterung wieder hervorgerufen werden können[5]). Im menschlichen Darmsaft haben Hamburger und Hekma[6]) keine Laktase gefunden.

Brustdrüsen von säugender Katze, Ziege, Kuh zeigten keine Laktosespaltung. Auch ist es zweifelhaft, ob Milch Laktase enthält[7]).

Pankreas soll weder beim Säugling[8]) noch beim ausgewachsenen Menschen[9]) und nach E. Fischers und Niebels Befund auch nicht bei Pferd und Rind Laktase enthalten; wogegen Weinland[10]) im Hundepankreas Laktase fand, die bei Milchfütterung zunahm. Gegenteilige Angaben von Bierry[11]) und Plimmer[12]).

In anderen Organen höherer Tiere ist Laktase nicht angetroffen worden.

Der Verdauungstraktus von Helix pomatia spaltet Milchzucker[13]); ungewiss ist, ob dieses Enzym mit der Laktase höherer Tiere identisch ist.

Andererseits bestehen vielleicht zwischen diesen und pflanzlichen Laktasen ähnliche Unterschiede wie zwischen den Saccharasen.

[1]) Bierry und Giaja, C. r. 147, 268; 1908.
[2]) Bierry C. r. 148, 949; 1909.
[3]) Röhmann und Lappe, Chem. Ber. 28, 2506; 1895. — Portier, Soc. Biol. 50, 387; 1898. — Bierry und Salazar, Soc. Biol. 57, 181; 1904.
[4]) Porcher, Soc. Biol. 83, 420; 1920.
[5]) Foà, Arch. di Fisiol. 8, 121; 1910.
[6]) Hamburger und Hekma, Jl de Physiol. Pathol. gén. 4, 805; 1902.
[7]) Vandevelde, Biochem. Zs 11, 61; 1908. — Bradley, Jl Biol. Chem. 13, 431; 1913. — M. Hahn, Münch. med. Wochenschr. 1911.
[8]) Ibrahim, H. 62, 287; 1909.
[9]) Glaessner, H. 40, 465; 1903.
[10]) Weinland, Zs Biol. 38, 607; 1899.
[11]) Bierry, Soc. Biol. 58, 701; 1901.
[12]) Plimmer, Jl of Physiol. 35, 20; 1906.
[13]) Bierry und Giaja, Soc. Biol. 60, 1038; 1906.

Über die Wirkungsbedingungen der tierischen Laktasen ist nichts Näheres bekannt.

Eine Antilaktase wurde durch subkutane Injektion von Kefirlaktase gesucht (vgl. I. Tl., S. 277).

Zerlegung von Milchzucker im Blut nach subkutaner Injektion. Abderhalden[1]) hat im Anschluss an seine Arbeiten über „Abwehrfermente" mit Brahm diesbezügliche Versuche angestellt, und schliesst daraus, dass nach subkutaner Injektion des „blutfremden" Milchzuckers „das Plasma resp. Serum Eigenschaften annimmt, die vor den Injektionen nicht nachweisbar sind. Alles deutet darauf hin, dass Fermente auftreten, die die genannten Zuckerarten in ihre Komponenten zerlegen".

Bestätigungen dieses Ergebnisses wären offenbar von grossem Interesse.

2. Laktosespaltung durch Mandelemulsin.

Die Milchzuckerspaltung durch Mandelemulsin ist besonders von H. E. und E. F. Armstrong[2]) und ihren Mitarbeitern und neuerdings von Willstätter und Csányi[3]) untersucht worden.

Das hierbei wirksame Enzym nennen wir im folgenden, dem Vorschlag von Bourquelot und Hérissey[4]) folgend, Laktase; es muss dabei aber ausdrücklich betont werden, dass eine sichere Abgrenzung noch nicht gegen alle anderen Emulsinbestandteile durchgeführt ist[5]), und dass andererseits dieses Mandelenzym mit der Kefirlaktase vielleicht nicht[2]), und mit den tierischen Laktasen wahrscheinlich nicht identisch ist.

Willstätters Tabelle über den Einfluss von Mandelpräparaten auf Laktose und andere Substrate ist bereits Seite 241 mitgeteilt.

Vorkommen: Es sei hier auf den Abschnitt „Emulsin", S. 210 u. ff., verwiesen und auf die dort angegebenen Reinigungsmethoden.

Wirkungsbedingungen: Die optimale Azidität lässt sich aus den von Willstätter mitgeteilten Kurven, Fig. 34 S. 243, entnehmen, sie liegt im pH-Gebiet 4,2—4,6; bei pH = 3 ist die Wirkung noch bedeutend; das zeigt auch folgender Auszug aus einer von Willstätter angebenen Tabelle:

pH	3,2	3,8	4,4	4,9	6,0	7,0	8,0
Rel. Wirksamkeit .	62	85	100	91	62	14,5	4,5.

Einfluss von Alkohol. Bemerkenswert ist die von Bridel[6]) festgestellte Tatsache, dass Mandellaktase noch in 85%igem Äthylalkohol zu spalten vermag.

---

1) Abderhalden und Brahm, H. 64, 329; 1910.

2) H. E. und E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 80, 321; 1908.

3) Willstätter und Csányi, H. 117, 172; 1921.

4) Bourquelot und Hérissey, Soc. Biol. 55, 219; 1903.

5) Willstätter (l. c.) hat gezeigt, dass das Verhältnis der Laktase zu Prunase im Emulsin veränderlich ist, nämlich 577 bei Aprikosenkernen, 3740 in einem Handelspräparat.

6) Bridel, C. r. 173, 501; 1921. — Bezgl. Methylalkohol, Jl Pharm. Chim. (7) 22.

Kinetik.

Die Messungen von Armstrong sind offenbar durch die Inkonstanz der Azidität (Mangel an Puffer) mehr oder weniger beeinflusst. Wir führen trotzdem einige Zahlen aus seinen Untersuchungen über Mandelemulsin an[1]). Neben den Versuchszeiten sind die gespaltenen Mengen Milchzucker in Prozenten und in der 3. Kolumne die nach der Formel für monomolekulare Reaktionen berechneten Reaktionskoeffizienten angegeben. Die 4. Kolumne ist vom Verf. berechnet.

2 g Milchzucker, 0,2 g Emulsin in 100 ccm

Min.	x	$k \cdot 10^4$	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
0,5	3,2	282	4,5
1	4,8	214	4,8
2	6,4	143	4,5
3	7,6	114	4,4
4,5	9,0	91	4,2
6	10,0	91	4,1
23	19,7	41	4,1
29	22,0	37	4,1
48	29,0	31	4,2
53	30,7	30	4,2
144	62,2	29	5,2
264	77,5	24	4,9

2 g Milchzucker, 0,4 g Emulsin in 100 ccm

Min.	x	$k \cdot 10^4$	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
1	4,9	218	4,9
2	7,5	169	5,3
4,5	9,4	95	4,4
6	10,6	81	4,3
23	30,5	69	2,0
29	35,5	64	2,0
48	47,8	59	2,2
53	50,0	57	2,2
144	84,0	55	7,0

Eine einfache Beziehung zwischen Reaktionszeit und umgesetzter Menge ist aus diesen Zahlen nicht ohne weiteres ersichtlich; ebensowenig geht aus den in der erwähnten Arbeit gegebenen Tabellen eine einfache Beziehung zwischen der Geschwindigkeit der Reaktion und der Enzymkonzentration hervor.

Spätere Versuche (Proc. Roy. Soc. 80, 326; 1908) geben einen engeren Anschluss an den Verlauf monomolarer Reaktionen, wenn mit relativ viel Enzym (Mandelextrakt) gearbeitet wurde.

5%ige Milchzuckerlösung.

	40 ccm Enzymlösung		60 ccm Enzymlösung	
Stunden	x	$k \cdot 10^4$	x	$k \cdot 10^4$
2	15,2	358	18,5	444
3	18,5	296	22,7	373
5	21,1	251	36,5	394
7	33,5	253	44,9	380
9	42,2	264	52,5	360
10	44,0	252	53,5	332
24	73,4	240	76,0	258

Wie die dritte und fünfte Spalte ergibt, wurde auch bei diesen Versuchen keineswegs durchgehende Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Geschwindigkeit gefunden; nur relativ kleine Enzymmengen hydrolysierten ihrer Konzentration proportional.

[1]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B. 73, 500, 516, 526; 1904.

Die folgende Tabelle ist der Untersuchung von Willstätter und Csányi entnommen:

0,7 %ige Lösung, 500 mg Emulsin; pH = 4,4. 30°.

Stunden	x	$k \cdot 10^4$
4	15	410
7	24	390
21	55	380
24	61	390
30	69,5	396
46	85	410

Hier zeigt sich also eine recht befriedigende Konstanz der k-Werte.

Armstrong gab folgende Tabelle über den Einfluss der Laktase-Konzentration auf die Spaltungsgeschwindigkeit einer 5 %igen Milchzuckerlösung; sie zeigt die gespaltenen Zuckermengen in Prozenten (l. c. 73, 510).

ccm Laktase	1,5 Stunden	20 Stunden	25 Stunden	45 Stunden	68 Stunden
1,0	0,15	2,2	2,6	3,9	4,8
2,5	0,4	5,8	6,8	10,2	12,6
10	1,6	23,3	—	38,6	48,5
20	3,2	45,8	54,5	—	—

Die pro Zeiteinheit hydrolysierten Quantitäten werden also den Enzymkonzentrationen, solange diese nicht sehr gross sind, angenähert proportional gefunden. Dies zeigen auch die folgenden Zahlen (Proc. 80, 326).

Enzymmenge:	10	20	40	60 ccm
Geschwindigkeits-Konstante $k \cdot 10^4$:	107	212	279	385

Dann hört ihre Wirksamkeit auf, was so gedeutet wurde, dass die Spaltprodukte Glukose und Galaktose das Enzym binden und es dadurch der Reaktion mit dem Substrat entziehen.

Über den Einfluss der Spaltprodukte haben H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton (Proc. 80) weitere Versuchsreihen angestellt, von welchen hier eine (l. c. 328) mitgeteilt sei:

5 g Milchzucker in 100 ccm. 40 ccm Extrakt aus bitteren Mandeln + 5 g Glukose oder Galaktose.

Stunden	g Milchzucker gespalten		
	ohne Zusatz	Glukose	Galaktose
2	0,35	0,05	0,36
5	0,85	0,10	0,88
10	1,225	0,37	1,23
24	2,025	0,75	1,96

Hier übt also Glukose eine stark hemmende Wirkung aus, was bei der Kefirlaktase nicht der Fall ist.

Variiert man die Milchzuckermenge, so findet man, wenn relativ viel Enzym zugegen ist, Proportionalität zwischen der Zuckerkonzentration und der in der Zeiteinheit gespaltenen Menge, also gleiche Werte für die Reaktionskoeffizienten k.

Gespaltene Milchzuckermengen in Prozenten:

Milchzucker in 100 ccm	Gespalten nach 3 Stunden	$k \cdot 10^4$
1,0 g	0,185	296
0,5 g	0,098	298
0,2 g	0,0416	337

Für relativ grosse Substratmengen wird die prozentische Menge gespaltenen Zuckers umgekehrt proportional der Zuckerkonzentration, so dass also in der Zeiteinheit gleiche absolute Mengen Zucker gespalten werden, welches auch seine Konzentration ist.

Einfluss der Temperatur.

H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton (l. c. 80, 325) beschreiben bemerkenswerte Temperatureinflüsse auf das Emulsin.

Eine von ihnen aus Mandeln hergestellte Emulsinlösung war bei 15° gegen β-Methylglukosid ziemlich wirksam, während Milchzucker nur wenig angegriffen wurde; dagegen wurden bei 36° beide Substrate verhältnismässig rasch hydrolisiert. Dies liesse auf einen hohen Temperaturkoeffizienten der enzymatischen Milchzuckerspaltung durch die Mandel-Laktase schliessen.

Wurde der Extrakt ca. 3 Stunden auf 45° erwärmt, so verlor er dadurch vollständig seine Wirkung gegen Milchzucker, dagegen behielt er seine Aktivität gegen β-Methylglukosid, Amygdalin und Salicin nicht allein nach 20stündiger Erhitzung auf 45°, sondern nach mehrstündiger Erhitzung auf 55° in Gegenwart dieser Substrate; erst Erhitzen auf 59° zerstörte. (In Betracht zu ziehen ist, dass sich die Laktase in einer für ihre Stabilität ungünstigen Azidität befunden haben kann.)

Ferner beschreiben die englischen Autoren einen qualitativen Versuch, bei welchem sie Mandeln bei 0° und darauf bei 45° mit Wasser extrahieren. Aus der Wirksamkeit der beiden Extrakte bei 38° und bei 15° glauben sie den Schluss ziehen zu können, dass die Laktase vorzugsweise bei der niedrigen Temperatur extrahiert wurde. Quantitative Messungen wären wünschenswert.

3. Laktase in Pilzen und Bakterien.

Vorkommen. In Milchzuckerhefen (Saccharomyces Kefir und Sacch. Tyrocola) von Beijerinck[1]) und von E. Fischer[2]) nachgewiesen. Aus armenischer Mazunhefe gewannen Buchner und Meisenheimer[3]) einen Presssaft, welcher Milchzucker spaltete. Über wirksame Saccharomyceten siehe S. 290. Im allgemeinen wird die Fähigkeit Milchzucker zu spalten den Torulaceen

[1]) Beijerinck, Zbt Bakt. 6, 44; 1889.
[2]) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 2985 und 3479; 1894.
[3]) Buchner und Meisenheimer, H. 40, 167; 1903.

zugeschrieben [1]), wie denn auch die von Duclaux und Adametz beschriebenen Milchzuckerhefen als Torulaarten aufgefasst werden. Indessen muss hierzu bemerkt werden, dass der Nachweis von „Laktase" vielfach dadurch geführt worden ist, dass die Fähigkeit der betreffenden Mikroorganismen, Milchzucker zu vergären, gezeigt wurde. Nachdem neuerdings Willstätter [2]) die Auffassung ausgesprochen hat, dass auch eine direkte Vergärung des Milchzuckers (ohne vorhergehende Hydrolyse) eintreten kann und oft eintritt, ist also — wie man sich auch zu dieser Annahme stellt — jedenfalls genau darauf zu achten, in welcher Weise der Nachweis einer Laktase in den einzelnen Fällen geführt worden ist.

Schliesst man sich übrigens der Auffassung von Willstätter an, so muss man die bisherige Darstellung vom Zusammenwirken der Streptokokken a und b (v. Freudenreich) mit der Kefirhefe und die Auffassung der Rolle der Milchsäurebakterien etwas modifizieren.

Auch anderen Streptobazillen wird die Fähigkeit der Laktosespaltung zugeschrieben.

Ausser in Torulaceen ist Milchzuckerspaltung noch in Aspergillaceen und in Mucorarten nachgewiesen worden.

Wegen der zahlreichen weiteren Angaben über Milchzuckerspaltung verweisen wir auf das Handbuch von Lafar [3]), ausserdem auf eine bemerkenswerte Arbeit von H. Pringsheim und Zemplén [4]).

Indessen ist hier eine Angabe von Pottevin zu prüfen, dass Aspergillus niger nur eine β-Glukosidase, keine β-Galaktosidase und keine Laktase enthält (vgl. S. 214).

Über den Laktasegehalt einiger Milchzuckerhefen gibt folgender Auszug aus einer Tabelle von Willstätter und G. Oppenheimer Auskunft.

Hefe	Nährlösung	Laktase-Zeitwert
S. fragilis	Hefedekokt; 3 Proben	17—60
„	Bierwürze	2880; 2700
„	„	300—1560 [5])
Berlin Sp. 60 a	anorganische Nährlösung + Pepton	11—7
„ „	kalter Malzauszug	35—25
„ „ 102	anorganische Nährlösung + Malzauszug	60

Darstellung. Als Ausgangsmaterial wurden von Fischer, Armstrong, Barendrecht Kefirkörner verwendet. Man findet Angaben über

[1]) Siehe hierzu Will und Scheckenbach, Zbt Bakt. II, 35, 1; 1912.

[2]) Willstätter und Oppenheimer, H. 118, 168; 1922.

[3]) Lafar, Handbuch d. techn. Mykologie, 2. Aufl., 1904—1907; siehe besonders Bd. I und IV. Siehe ferner Heintze und Cohn, Zs Hygiene 46, 286; 1904.

[4]) H. Pringsheim und Zemplén, H. 62, 367; 1909.

[5]) Kleine Versuchszeiten scheinen hier kleine Zeitwerte zu ergeben.

die Bereitung von Kefirlaktase[1]) bei Fischer und Zemplén[2]) und Armstrong[3]). Kefirkörner des Handels sind nach Erfahrungen von Willstätter, die Verf. bestätigen kann, oft sehr wenig wirksam.

Willstätter und G. Oppenheimer haben Reinkulturen angewandt:

1. Von Sacch. fragilis Jörgensen[4]). (Weitergezüchtet mit Hefedekokt unter Zusatz von 7—10% Laktose bei 26°: Ausbeute in 3 Kolben von je 3 l zusammen 8—20 g. Bei Anwendung von Bierwürze schien die Hefe ärmer an Laktase zu sein.)

2. Von 2 Milchzuckerhefen Sp. 60 a und Sp. 102 aus dem Berliner Institut für Gärungsgewerbe. (In anorganischer Nährlösung + Pepton oder in kalt bereitetem Malzauszug oder in einer Mischung beider + 10% Milchzucker betrug die Ausbeute in 2 Wochen 2,5—3 g.)

Laktase lässt sich in der frischen Hefe nicht direkt, etwa wie Saccharase in Bierhefe, bestimmen. Die Methode der Maltasebestimmung in Hefe von Willstätter und Steibelt[5]) (siehe S. 157 und 158) liess sich auch auf Laktase übertragen.

„Wird die Hefe mit dem abtötenden Mittel sorgfältig verrieben, so tritt im allgemeinen keine Gärung mehr ein, aber Ausnahmen kommen vor, sogar nach zweitägiger Einwirkung von Chloroform oder Toluol." „Bei der Laktase fällt durch die Gärung der Zeitwert zu niedrig aus. Es wäre am besten, die Analyse so zu vervollkommnen, dass nach der Zeitwertbestimmung die Hydrolyse bis zum Ende weitergeführt würde, wobei ein Zuckerverlust durch Gärung nicht unbemerkt bliebe."

Bestimmung der Laktase siehe S. 297 u. ff.

Während bei der Saccharasedarstellung die Enzymausbeute im Extrakt + Heferückstand gewöhnlich gleich dem des Ausgangsmaterials ist, erhielten Willstätter und Oppenheimer bei der Bestimmung der Laktase in den Hefeauszügen + Rückständen Verluste.

„Um ohne Trocknung aus der Hefe Laktase zu isolieren, wurde die Hefe (5 g S. fragilis vom Zeitwert 300) in frischem Zustand durch Verreiben während etwa 10 Minuten mit 1 ccm Chloroform verflüssigt, dann mit 7 ccm Wasser verdünnt und vorsichtig mit 1,1 ccm 1%igem Ammoniak neutralisiert. Im Laufe von 6 Stunden war die Flüssigkeit wieder merklich sauer, sie verbrauchte noch 0,3 ccm Ammoniak. — Nach etwa 3 Tagen wird die Laktaselösung abfiltriert; Ausbeute beispielsweise 77% (nach 3 Tagen)."

„Es ist mühsamer und nicht ergiebiger, die enzymatische Freilegung zu ersetzen durch weitgehende Zerstörung der Zellstruktur des Pilzes."

Beispiel der Darstellung von Laktase aus luftgetrockneter Hefe ohne Zerkleinerung und ohne Toluolzusatz: l. c. S. 181.

Wirksamkeitsbedingungen. Als optimale Aziditätszahl der Hefenlaktase nimmt Willstätter mit Vorbehalt 7 an. Diese Azidität wird mit 10 ccm Phosphatpuffer nach Sörensen im Verhältnis 3,8 prim. : 6,2 sek. Salz eingestellt; grosse Puffermenge zweckmässig.

---

[1]) Über Züchtung der Kefirhefe siehe auch Barendrecht, Zs physik. Chem. 54, 367; 1906.
[2]) E. Fischer und Zemplén, Lieb. Ann. 372, 254; 1910.
[3]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B 73, 500; 1904.
[4]) A. Jörgensen, Die Mikroorganismen in der Gärindustrie, 5. Aufl., Berlin 1909, S. 377.
[5]) Willstätter und Steibelt, H. 111, 157; 1920.

Sehr widerstandsfähig ist nach einer Beobachtung von Bridel[1]) die Laktase gegen Methylalkohol. In Lösung von 70% Methylalkohol behielt ein Emulsinpräparat seine Aktivität gegen Milchzucker und gegen Äthylgalaktosid während 5 Jahren.

Paralysatoren. Toluol, Chloroform und Essigester scheinen die Wirkung der von Willstätter und Oppenheimer dargestellten Laktase nicht zu hemmen. Die von diesen Autoren beobachteten Verschiedenheiten in der Geschwindigkeit der Laktosespaltung bei Anwendung verschiedener abtötender Mittel wird von ihnen auf eine ungenügende Unterdrückung der Gärwirkung zurückgeführt.

Kinetik.

Die ersten Versuche hat Armstrong (l. c.) mit Kefirenzym 1904 ausgeführt, mit der nicht ganz befriedigenden Versuchsanordnung der damaligen Zeit.

2 g Milchzucker per 100 ccm.

I			II		
100 ccm Enzym-Extrakt			40 ccm Enzym-Extrakt		
Stunden	x	k · 10·	Stunden	x	k · 10
1	22,1	1085	0,33	3,2	423
2	31,2	812	0,66	6,4	430
3	38,9	713	1	9,6	438
4	45,8	665	1,5	13,2	410
5	51,5	629	2	16,4	389
6	56,6	664	3	20,8	338
10	69,0	509	5	25,2	252
17	84,2	471	23	47,6	122
23	92,4	461	100	89,6	82

Barendrecht[2]) fand mit ziemlich wirksamem Kefirextrakt in 8%iger Milchzuckerlösung bei 30° eine starke Abnahme von k mit der Zeit.

Auch Willstätter und Oppenheimer stellen bei ihren mit moderner Methodik ausgeführten Messungen eine deutliche Abnahme der Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung fest.

5% Laktose. — Laktase aus 0,8 g S. fragilis. — 30°. — pH = 7.

Minuten	mg Cu	% Spaltung	$k \cdot 10^4$
0	62,4	—	—
30	69,4	28	48
52	71,9	37	39
60	72,6	40	37
70	73,9	43	35
80	75,2	47	34,5
90	75,8	49	32,5
110	77,1	55	31,5
135	78,8	62	31
172	80,3	65	26,5
210	81,8	69	24
270	83,3	73,5	21
390	85,8	84	20
550	87,3	87,5	18

[1]) Bridel, Jl de Pharm. et de Chim (7) 22, 323; 1920.

[2]) Barendrecht, Zs physik. Chem. 54, 369; 1906. Auf die Strahlungshypothese dieses Forschers ist schon im I. Teil, S. 242 hingewiesen worden.

Was die Proportionalität von Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge betrifft, so fanden die gleichen Autoren „bei Versuchen mit wenig Laktase und sehr langer Dauer zu geringen Umsatz, offenbar deshalb, weil das empfindliche Enzym verdarb". Indessen fanden sie im engen Bereich (1 : 2) genau bestätigt, dass die Zeiten gleichen Umsatzes sich umgekehrt wie die Enzymmengen verhalten.

5 ccm Enzymlösung in 4 Stunden 14 % Spaltung
10 ccm „ „ 2 „ 14 % „ .

Bemerkenswert ist der verschiedene Einfluss, welchen die Spaltprodukte Glukose und Galaktose auf die Wirkung der Kefirlaktase und des Emulsins ausüben. Es sei diesbezüglich auf die Untersuchung von E. F. Armstrong[1]) verwiesen, aus dessen Tabelle folgender Auszug stammt:

Enzym	Substrat	Wirkung d. Glukose	Wirkung d. Galaktose	Wirk. d. Fruktose
Kefir-Laktase	Milchzucker Alkyl-β-Galaktoside	keine Wirkung	Verzögerung	keine W.
Emulsin	β-Glukoside	starke Verzögerung	geringe Verzögerung	keine W.

Über den Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Hefenlaktase und über den Temperaturkoeffizienten der Hydrolyse liegen noch keine Messungen vor.

Laktase in der lebenden Hefe.

Wie schon erwähnt, hat Willstätter die Auffassung geäussert und durch sehr wichtige quantitative Versuche gestützt, dass in Milchzuckerhefen eine direkte Vergärung der Laktose ohne vorhergehende Spaltung eintreten kann. Da es sich gegenwärtig kaum entscheiden lässt, ob dies die einzig mögliche bzw. die einfachste Deutung seiner experimentellen Ergebnisse ist, mag eine Diskussion dieser interessanten und schwierigen Frage hier unterbleiben; bei der Besprechung der Hefezymasen werden wir darauf zurückkommen müssen, und auch bei der Beschreibung der Enzyme der Milchsäurebakterien und anderer Laktose-verbrauchender bzw. -vergärender Bakterien (Coli u. a.) taucht das gleiche Problem auf.

Hier mag aus der Arbeit von Willstätter und Oppenheimer noch folgendes Zitat Platz finden:

„In der lebenden, gärenden Hefe wirkt die Laktase nicht wie in der abgetöteten. Entweder ist die Laktase noch gar nicht in dem (nach Willstätter) quantitativ bestimmten Betrage in der lebenden Hefe vorhanden, entsteht erst nach der Abtötung aus einem Zymogen, oder wahrscheinlicher, die Laktose findet in der lebenden Hefezelle nicht die Bedingungen, unter denen sie der enzymatischen Hydrolyse unterliegt wie unter den für die quantitative Bestimmung ausgewählten." Der Verf. möchte dagegen einst-

[1]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. 73, 516: 1904.

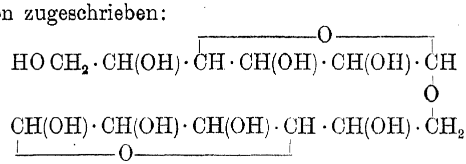
weilen die Auffassung beibehalten, dass die Laktase zum grossen Teil erst bei der Abtötung der Hefe (aus dem Protoplasma, das man in diesem Sinne auch als Zymogen bezeichnen kann) frei gemacht wird.

Enzymbildung.

Dienert[1]) hat eine Reihe von Beobachtungen über die Akklimatisierung der Hefe an verschiedene Kohlehydrate mitgeteilt. Unter anderem hat er auch gefunden, dass bei der Anpassung an das Substrat Laktose die Bildung bzw. die Abscheidung des entsprechenden Enzyms, der Laktase, gefördert wird. Verf. hat die Ergebnisse dieses Forschers nicht durchweg bestätigen können, indessen gewinnen sie durch die neuen Ergebnisse von Willstätter erhöhtes Interesse. Wie Willstätter schreibt, „bieten die Gärwirkungen der Milchzuckerhefen bei quantitativer Beobachtung ihres Verlaufs grosse Unregelmässigkeiten, die sich nur so verstehen lassen, dass die enzymatische Ausrüstung dieser Hefen in hohem Masse veränderlich ist“. Ein eingehendes Studium der Enzymbildung, wie es Verf. für die Saccharase begonnen hat (vgl. I. Teil S. 284ff.) führt vielleicht hier zu einer Einsicht in die chemischen Bedingungen der Enzymbildung (Einfluss von N-haltigen Nährstoffen, Anionen, Spuren gewisser Metallionen und Biokatalysatoren).

C. Melibiase.

Substrat: Der aus der Raffinose (S. 204) entstehenden Melibiose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, $\alpha]_D = +143^0$ (wasserfrei), wird von Haworth und Leitch[2]) folgende Konstitution zugeschrieben:



Galaktoserest

Glukoserest.

Wahrscheinlich synthetisch erhalten von Fischer und E. F. Armstrong[3]).

Vorkommen. Das Enzym ist in den meisten Unterhefen vom Frohberg- und Saaz-Typus, mit einer Ausnahme in allen untergärigen Betriebshefen gefunden worden[4])[5]), scheint aber in Oberhefen zu fehlen, so dass die Fähigkeit zur Vergärung von Melibiose geradezu als Charakteristikum der Unterhefen angesehen wird; Ausnahmen kommen aber in beider Hinsicht vor[6]). Milchzuckerhefen sollen Melibiose nicht vergären. Eine eingehende Untersuchung über die Melibiosespaltung verdankt man A. Bau[5]). Auch

[1]) Dienert, C. r. 129, 63; 1899.

[2]) Haworth und Leitch, Jl Chem. Soc. 113, 188; 1919.

[3]) Fischer und Armstrong, Chem. Ber. 35, 3144; 1902.

[4]) E. Fischer und Lindner, Chem. Ber. 28, 3034; 1895. — A. Bau, Zs. f. Spiritus Ind. 17, 374; 1894.

[5]) Bau, Woch. Brau. 19, 44; 1902 und 20, 560; 1903.

[6]) Siehe hierzu Lafar, Handbuch, IV. Bd., 416ff.

Lindner hat eine grössere Anzahl Hefen auf Melibiosevergärung[1]) hin untersucht. Nachdem nun aber Willstätter bei der Saccharose, Maltose und Laktose eine direkte Vergärung angenommen hat, wird immerhin der Nachweis einer Melibiase durch die Vergärung unsicher.

H. Pringsheim und Zemplén[2]) haben die Melibiosespaltung durch zahlreiche Schimmelpilze mit negativem Resultat untersucht.

Fischer und Armstrong (l. c.) erzielten Melibiosespaltung auch durch Mandel-Emulsin, nicht aber durch Kefirenzyme.

Darstellung. Das Enzym ist in Dauerhefe bzw. Trockenhefe wirksam. Bau l. c. trocknete seine Frohberg-Hefe bei 30—35°, erhitzte sie langsam zweimal 4 Stunden auf 100°. Die unter aseptischen Bedingungen hinzugefügte Melibiose wurde in 14 Tagen bei 28° vollständig gespalten, so dass nur Monosen zugegen waren.

Auch ein wirksamer Hefepresssaft kann dargestellt werden.

Über die optimale Azidität der Melibiase ist noch nichts bekannt.

Den Einfluss der Temperatur hat Bau insofern untersucht, als er an Presssaft eine Optimaltemperatur festzustellen suchte; er gibt an für:

Saccharase	52°
Melibiase	50°
Maltase	40°.

Nach Versuchen mit den Hefen selbst (Erwärmen in 2%iger Zuckerlösung) gibt Bau folgende Tötungstemperaturen an:

Maltase	55°
Melibiase	70°
Saccharase	75°.

Zur Kritik der „Optimaltemperatur“ und „Tötungstemperatur“ siehe Teil I, S. 189 und 196.

Dienert[3]) glaubt eine Anpassung von Hefen an Melibiose festgestellt zu haben.

D. Spaltung synthetischer Gluko-Galaktoside und Galakto-Galaktoside.

Gleichzeitig mit der Biose, welche vermutlich mit Melibiose identisch ist, haben Fischer und Armstrong (Chem. Ber. 35) noch einen weiteren damit isomeren Zucker aus Glukose und Galaktose gewonnen und ferner ein Galakto-Galaktosid.

---

[1]) Lindner, Woch. Brau. 17, 713; 1900.

[2]) H. Pringsheim und Zemplén, H. 62, 369; 1909.

[3]) Dienert, C. r. 129, 63; 1899.

Über das Verhalten dieser Substanzen zu den in Betracht kommenden Enzymen geben die beiden Forscher folgende Tabelle. Der negative Ausfall des Versuches ist durch einen Horizontalstrich ausgedrückt.

Zucker	Oberhefe	Unterhefe	Emulsin	Kefir-Laktase
Milchzucker	—	—	hydrolysiert	hydrolysiert
Isolaktose	—	vergoren	—	hydrolysiert
Melibiose	—	vergoren	hydrolysiert	—
Galaktosidoglukose . . .	—	vergoren	hydrolysiert	—
Glukosidogalaktose . . .	—	vergoren	hydrolysiert	—
Galaktosidogalaktose . .	—	—	hydrolysiert	—

Sehr bemerkenswert ist ferner die biochemische Synthese zweier Gluko-Galaktoside, welche Bourquelot und Aubry mit Hilfe von Emulsin[2]) durchgeführt haben. Ihre gut definierten kristallisierten Produkte sind mit den von Fischer und Armstrong erhaltenen nicht identisch.

Die von ihnen gewonnenen Galaktoside werden durch Emulsin wieder gespalten, bei der Galaktobiose II verlief sowohl Synthese als Spaltung sehr

Anhang.

1. Spaltung der Mannotriose.

Mannotriose, $C_{18}H_{32}O_{16}$, Schmelzpunkt 150°, $[\alpha]_D^{20} = 167^0$ entsteht aus Stachyose (S. 208). Wird durch Säuren in 1 Mol. Glukose und 2 Mol. Galaktose gespalten. Man schreibt diesem Zucker folgende Zusammensetzung zu:

Gluko-Galaktose
Glukose — Galaktose — Galaktose
Digalaktose

Neuberg und Lachmann erzielten durch Emulsin eine Spaltung in Glukose und Digalaktose.

Nach Bierry tritt durch den Verdauungssaft von Schnecken vielleicht die zweite mögliche Spaltung in Galaktose und Gluko-Galaktose ein.

2. Spaltung der Stachyose.

Das Substrat ist bereits S. 208 und 209 besprochen worden. Der Digalaktoserest geht in die eben erwähnte Mannotriose ein.

[1]) Bourquelot und Aubry, Jl de Pharm. et de Chim. (7) 14, 65; 1916. — 15, 273 1917. Bourquelot, Ann. de Chim. (9) 13, 1; 1920.

[2]) Auch mit getrockneter untergäriger Bierhefe tritt vermutlich eine Synthese von Gluko-Galaktosiden ein.

E. Methoden zur Bestimmung der Galaktoside und ihrer Spaltung.

In erster Linie kommen hier die Methoden in Betracht, durch welche die Hydrolyse des Milchzuckers verfolgt werden kann.

Die polarimetrische Messung, welche bei der Rohrzuckerinversion so ausgezeichnete Dienste leistet, ist zur Bestimmung der Laktosespaltung deswegen wenig geeignet, weil die Drehung im Verlauf der Hydrolyse nur unbedeutend (rund 1 : 1,3) steigt. Dagegen liesse sich die Spaltung der Alkyl-β-Galaktoside polarimetrisch verfolgen.

Eine Bestimmung des Milchzuckers neben den Spaltprodukten kann qualitativ (und schätzungsweise quantitativ) durch Herstellung der Osazone geschehen.

Eine von A. W. van der Haar[1]) vorgeschlagene Methode zur Bestimmung freier und gebundener Galaktose beruht auf der Oxydation dieses Zuckers zu Schleimsäure.

Legrand[2]) versuchte neuerdings eine Methode darauf zu gründen, dass Barfoedsche Lösung nur von den Hexosen, nicht von Laktose reduziert wird.

Reduktionsmethode nach Bertrand[3]).

Bei der Verfolgung der Spaltung mit der Reduktionsmethode ist zunächst zu erwägen, dass sowohl Laktose als seine Produkte Reduktionsvermögen besitzen.

Für reine Laktoselösungen[4]) gibt Bertrand folgende Tabelle.

Fünfte Kristallisation: $[\alpha]_D = \frac{+13^0 63 \times 50 \text{ ccm}}{2,500 \text{ g} \times 5 \text{ d}} = +54^0 5 \; (t = 19^0)$.

Der angegebene Drehungswinkel bezieht sich auf das Hydrat: $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$, die Tabelle dagegen auf das Anhydrid.

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
10	14,4	23	32,5	36	50,1
11	15,8	24	33,9	37	51,4
12	17,2	25	35,2	38	52,7
13	18,6	26	36,6	39	54,1
14	20,0	27	38,0	40	55,4
15	21,4	28	39,4	41	56,7
16	22,8	29	40,7	42	58,0
17	24,2	30	42,1	43	59,3
18	25,6	31	43,4	44	60,6
19	27,0	32	44,8	45	61,9
20	28,4	33	46,1	46	63,3
21	29,8	34	47,4	47	64,6
22	31,1	35	48,7	48	65,9

1) van der Haar, Biochem. Zs 81, 263; 1917.

2) Legrand, C. r. 172, 602; 1921.

3) G. Bertrand, Bull. Soc. Chim. 35, 1285; 1906. — Beschreibung der Methode am Ende dieses Buches.

4) Reine Laktoselösungen können auch jodometrisch nach der Methode von Willstätter und Schudel (Chem. Ber. 51, 780; 1918) bestimmt werden; diese sehr brauchbare Methode wird am Ende dieses Buches beschrieben.

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
49	67,2	67	90,3	85	112,9
50	68,5	68	91,6	86	114,1
51	69,8	69	92,8	87	115,4
52	71,1	70	94,1	88	116,6
53	72,4	71	95,4	89	117,9
54	73,7	72	96,6	90	119,1
55	74,9	73	97,9	91	120,3
56	76,2	74	99,1	92	121,6
57	77,5	75	100,4	93	122,8
58	78,8	76	101,7	94	124,0
59	80,1	77	102,9	95	125,2
60	81,4	78	104,2	96	126,5
61	82,7	79	105.4	97	127,7
62	83,9	80	106,7	98	128,9
63	85,2	81	107,9	99	130,2
64	86,5	82	109,2	100	131,4
65	87,7	83	110,4		
66	89,0	84	111,7		

Willstätter und Oppenheimer[1]) haben die Anwendbarkeit der Bertrand'schen Methode dadurch erhöht, dass sie unter den Verhältnissen der enzymatischen Laktosespaltung Kupferwerte von 10 zu 10% Spaltung ermittelten, indem sie 5%ige Lösungen der Laktose (wasserhaltig) und der äquimolekularen Gemische von Glukose und Galaktose in den verschiedenen Verhältnissen aus Büretten in 25 ccm-Kolben einfliessen liessen, wovon nach Erwärmen auf 30° je 5 ccm entnommen und auf 100 ccm aufgefüllt wurden. Zur Bestimmung dienten 20 ccm. Der Bestimmungsfehler überschreitet nicht ± 0,05 ccm Permanganat, aber dieser Differenz entspricht schon ein Unterschied von ± 2,5% Laktosespaltung.

Kupferzahlen der Gemische von Laktose und Glukose + Galaktose.

Laktose ccm	Glukose + Galaktose ccm	0,160 n. Perm. ccm	Cu (Mittel) mg
1,0	0	6,10; 6,15	62,35
0,9	0,1	6,30; 6,35	64,35
0,8	0,2	6,60; 6,65	67,45
0,7	0,3	6,90; 6,90	70,2
0,6	0,4	7,15; 7,15	72,8
0,5	0,5	7,45; 7,50	76,15
0,4	0,6	7,65; 7,70	78,15
0,3	0,7	8,09; 8,09	82,3
0,2	0,8	8,38; 8,38	85,3
0	1,0	9,00; 9,00	91,6

[1]) Willstätter und Oppenheimer, l. c.

Willstätter und Oppenheimer setzten ihre Versuche mit Laktase folgendermassen an: 25 ccm 10%iger Laktoselösungen mit 10 ccm $^1/_3$ mol. Phosphatmischung, wurden mit Enzym und Wasser auf 50 ccm gebracht. Reaktionstemperatur 30°. Proben von 5 ccm wurden in 5 ccm 2 n-Soda sistiert; $^1/_5$ der Mischung wurde zur Kupferbestimmung verwendet. Der Sodazusatz ist ohne Einfluss auf die Permanganatmengen.

Definition der Wirksamkeit.

Die Wirksamkeit des Mandelemulsins kann durch die Reaktionskonstante der Lösung und die angewandte Menge Enzympräparat bestimmt werden.

Bei der Hefenlaktase sind die Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung nicht konstant. Man ist hier auf die Festlegung eines Zeitwertes unter ganz bestimmten Bedingungen angewiesen. Willstätter misst die Wirksamkeit durch den Zeitwert in Minuten, welchen 1 g trockene Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung (vgl. S. 291) brauchen würde, um bei 30° und optimalem pH (= 7) in 50 ccm Lösung 2,5 g Laktose zu hydrolysieren.

Dass sich Laktase in frischer Hefe nicht, wie die Saccharase, direkt bestimmen lässt, ist bereits S. 291 erwähnt worden.

Kapitel 11.

Sinigrinase.

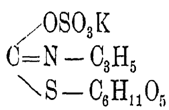
Unter den Senföl-Glukosiden ist Sinigrin (myronsaures Kalium) aus Brassica nigra das bekannteste; ihm reihen sich mehrere andere an, welche bei der Spaltung ebenfalls Isothiocyanate liefern. Diesen Glukosiden entspricht zweifellos ein ihnen spezifisches Enzym (evtl. eine Enzymgruppe).

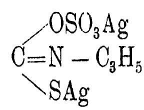
Bezüglich der Bezeichnung dieses Enzyms herrscht einige Verwirrung. Oft hat man dasselbe, dem Entdecker Bussy folgend, Myrosin genannt; später hat man diesen Namen, dessen Bildung eher auf ein Glukosid hindeutet, in Myrosinase verwandelt (Oppenheimer). Da aber das hauptsächliche Substrat Sinigrin ist, möchte ich vorschlagen, dem gebräuchlichen v. Lippmann angegebenen Nomenklaturprinzip gemäss, die Bezeichnung Sinigrinase allgemein anzunehmen.

Substrat: Das Sinigrin oder myronsaure Kalium (Will und Körner) Schmelzpunkt 126—127°, $[\alpha]_D = -15{,}5^0$ wird, wie durch die Untersuchungen von Gadamer[1]) nunmehr feststeht, unter dem Einfluss des Enzyms nach folgender Formel gespalten:

$$\underset{\text{Sinigrin}}{C_{10}H_{16}O_9NS_2K} + H_2O = \underset{\text{Allylsenföl}}{C_3H_5 \cdot N:CS} + \underset{\text{Glukose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Kaliumbisulfat.}}{KHSO_4}.$$

Die Konstitution ist nach Gadamer folgende (I):

I 

 II

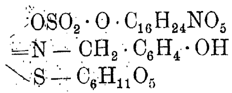
Auch durch die Isolierung der Thioglukose von Schneider und Wrede wird diese Formel gestützt (Chem. Ber. 47, 1258; 1914).

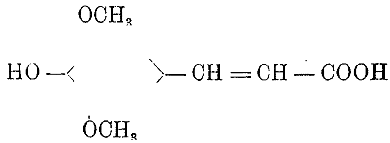
Versetzt man die wässrige Lösung mit Silbernitrat, so entsteht unter Abspaltung von Glukose Senfölsilbersulfat = sinigrinsaures Silber (II).

Eine ähnliche Konstitution (I) kommt nach Gadamer[2]) dem Sinalbin aus Sinapis alba zu:

[1]) Gadamer, Arch. d. Pharm. 235, 44, 577; 1897. — Chem. Ber. 30, 2322; 1897. — 32, 2335; 1899.

[2]) Gadamer, Chem. Ber. 30, 2327; 1897.

I 

 II

Es zerfällt in Glukose, Sinalbinsenföl und saures schwefelsaures Sinapin; das Sinapin ist ein Ester der Sinapinsäure (II) mit Cholin, und erstere kann als Abkömmling der Gallussäure aufgefasst werden.

Auch bei einigen weiteren Glukosiden ist — besonders durch Gadamer — die Senfölkomponente erkannt:

Glukosid aus	Tropaeolum majus und Lepidium sativum	enthält	Benzylsenföl[1])
„ „	Cochlearia	„	sek. Butylsenföl[2])
„ „	Nasturtium off. und Brassica rapa	„	Phenyläthylsenföl[3])

Schliesslich ist noch das durch die Arbeiten von W. Schneider[4]) bekannt gewordene Cheirolin-Glukosid aus Cheiranthus (Goldlack) zu erwähnen. Auch dieses liefert bei der enzymatischen Spaltung ausser Glukose und Cheirolin noch Schwefelsäure und Kalium. Das Cheirolin ist ein Senföl von der Zusammensetzung[5]):

Cheirolin $CH_3 - SO_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - NCS$
Allylsenföl $CH_2 = CH - CH_2 - NCS$.

Die unten stehende Formel des Allylsenföls veranschaulicht den nahen Zusammenhang zwischen beiden Stoffen.

Auch Homologe dieses Glukosids sind von Schneider[6]) synthetisiert worden.

Vorkommen. Charakteristisch ist die Sinigrinase für die Cruciferen, bei welchen sie mit den Senfölglukosiden besonders in den Samen, aber auch in verschiedenen Organen vorkommt. Sie ist aber nicht auf diese Familie beschränkt. Spatzier hat den Eintritt der Spaltung nach dem Senfölgeruch beurteilt und fand das Enzym ausserdem sowohl in Samen als in oberirdischen Organen der zur gleichen Ordnung gehörenden Resedaceen, ferner in Samen bei den Familien der Violaceen und Tropaeolaceen.

Bokornys[7]) Angabe, dass Sinigrinase in Hefen vorkommt, wurde von Neuberg und Färber[8]) weder in untergäriger Münchener Trockenhefe noch

[1]) Gadamer, Chem. Ber. 32, 2335, 1899. — Oxybenzylsenföl nach Beijerinck, Zbt f. Bakt. II, 5, 429; 1899.
[2]) Gadamer, Arch. d. Pharm. 239, 283; 1901.
[3]) Gadamer, Arch. d. Pharm. 237, 510; 1899. — Kunze, Arch. d. Pharm. 245, 660; 1908.
[4]) W. Schneider und Lohmann, Chem. Ber. 45, 2954; 1912.
[5]) W. Schneider, Lieb. Ann. 375, 218; 1910.
[6]) W. Schneider, Lieb. Ann. 386, 346; 1912.
[7]) Bokorny, Biochem. Zs 75, 376; 1916.
[8]) Neuberg und Färber, Biochem. Zs 78, 264; 1917.

in dessen Mazerationssaft noch in frischer Berliner Ober- und Unterhefe bestätigt gefunden. Auch Kossovicz hatte 1905 mit Hefen keine Sinigrinspaltung erzielt.

Guignard[1]) hat das Enzym ausserdem in Capparidaceen und sonst noch in einigen zu den Dikotylen gehörenden Familien gefunden, Bokorny in Leguminosen, Umbelliferen und Liliifloren. Was die von Guignard hierbei angewandte Methodik betrifft — sie stützt sich auf eine Beobachtung von Heinricher aus dem Jahr 1886 — so gibt dieselbe allerdings zu Bedenken Anlass und eine erneute kritische Untersuchung erscheint notwendig. Bezüglich der Verteilung des Enzyms in den Pflanzen kam Guignard zu folgenden Ergebnissen:

Wurzeln enthalten das Enzym besonders in der Rinde.

Stämme enthalten in der Rinde, im Pericykel und den davon abstammenden Geweben am meisten Enzym.

Blätter weisen sich besonders enzymhaltig bei einigen Papayaceen.

Blüten enthalten Sinigrinase z. B. bei Tropaeolum. Bei den Cruciferenblüten fand Guignard das Enzym in den Fruchtblättern.

Auch Spatzier[4]) hat durch Farbenreaktionen die Lokalisation des Enzyms näher studiert; bezüglich der Verbreitung der „Myrosinschläuche" sei auf das Original verwiesen.

Wirksamkeitsbereich. Es liegen bis jetzt keine Angaben vor, welche ungleiche Sinigrinasen in verschiedenen Pflanzen vermuten lassen[2]). Andererseits ist die Einheitlichkeit der bis jetzt gewonnenen Enzymlösungen nicht garantiert; es ist noch nach den einzelnen Komponenten zu suchen. Wichtig ist der von E. Fischer[3]) geführte Nachweis, dass Sinigrinase weder α- noch β-Methylglukosid angreift. Andererseits ist β-Phenylglukosidase (Emulsin) unwirksam gegen die Senfölglukoside.

Darstellung. Guignard zerkleinerte weisse Senfsamen und liess sie mehrere Stunden mit Wasser bei 40° stehen. Das Filtrat wurde auf 70° erhitzt, um den grössten Teil der Eiweisstoffe zu koagulieren. Nach Filtration wurde das Enzym durch das doppelte Volum 90%igen Alkohols abgeschieden, filtriert, getrocknet und mit Äther gewaschen.

Etwas anders verfuhren z. B. Schneider und Lohmann (l. c. 2960): „Der klare wässrige Auszug von 200 g weissem Senfmehl wurde durch Zusatz des gleichen Volumens Alkohol ausgefällt. Der abfiltrierte, ausgewaschene Niederschlag wurde dreimal mit Äther zur Entfernung mitgerissenen Sinalbin-Senföls ausgeschüttelt und dann hieraus der wässrige, myrosinhaltige Auszug hergestellt; die sauer reagierende Enzymlösung wurde dann neutralisiert.

Wirkungsbedingungen. Bei der Sinigrinspaltung bildet sich saures Sulfat, die Azidität der Lösung steigt also stark. Gadamer (Arch. 235) gibt

---

[1]) Guignard, Jl de Bot. 4, 385, 412, 435; 1890. — 6; 1893. — C. r. 111, 249. 920; 1890. Bull. Soc. Bot. France (3) 1, 418; 1894.

[2]) Smith, H. 12, 422; 1886. — Siehe hierzu auch z. B. die Beobachtung von Schneider (Chem. Ber. 45, 2955), dass das Enzym des Samens von Goldlack (Cheiranthus cheiri) das Sinigrin des schwarzen Senfs spaltet; umgekehrt gelang die Hydrolyse des Cheirolinglukosids durch Sinigrinase aus weissem Senf.

[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 3483; 1894.

[4]) Spatzier, Jahrb. wiss. Bot. 25, 93; 1893.

an, dass man, um eine Hemmung der Spaltung zu vermeiden, von Zeit zu Zeit die entstehende Säure abstumpfen muss. Ob aber Neutralität optimal ist, lässt sich noch nicht sagen.

Paralysatoren. Guignard fand, dass die hemmende Wirkung von Salizylsäure und von Chloral erst bei Mengen einsetzt, welche 1% übersteigen. Ähnliches gilt nach Bokorny (Chem. Ztg. 24) für Formaldehyd, Hydroxylamin u. a. Tonerde und Borax sollen bei 8% unschädlich sein. 1% Tannin hemmt stark. Die zur Vergiftung nötigen Mengen (auch $AgNO_3$ usw.) hängen natürlich vom Reinheitsgrad des Enzyms bzw. von der Art der Verunreinigungen ab.

Kinetik. Über den Verlauf der enzymatischen Sinigrinspaltung liegen einige Versuche von Tammann[1]) vor.

Einfluss der Temperatur. Soweit sich aus den Versuchen von Guignard und Bokorny, die orientierenden Charakter haben, etwas entnehmen lässt, soll Sinigrinase ein verhältnismässig thermostabiles Enzym sein.

Nachweis der Sinigrinspaltung. Der zeitliche Verlauf liesse sich vielleicht durch Bestimmung des abgespaltenen Sulfats ermitteln. Im übrigen sei auf die Methodik Schneiders (z. B. Chem. Ber. 45, S. 2960) verwiesen.

Anhangsweise sind noch die negativen Ergebnisse zu erwähnen, welche bis jetzt bezüglich der

Spaltung von Thiophenolglukosiden und von S-haltigen Biosen

erhalten worden sind.

Thiophenolglukoside haben E. Fischer und Delbrück[2]) synthetisiert; sie gehören vermutlich zur β-Reihe. Zu Spaltungsversuchen wurde Emulsin angewandt, das sich aber unwirksam erwies. Das Verhalten zu Sinigrinase scheint noch nicht geprüft zu sein.

In diesem Zusammenhang mag erwähnt sein, dass Thiophenol-Laktosid von Emulsin in der Biosegruppe unter Bildung einer reduzierenden Hexose angegriffen wird.

Auf das sehr interessante, von W. Schneider[3]) erhaltene Phenyl-thiourethan-d-Glukosid

$$C_6H_5 \cdot N : C \begin{matrix} \diagup S \cdot C_6H_{11}O_5 \\ \diagdown OC_2H_5 \end{matrix}$$

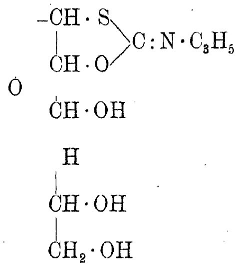
ist Sinigrinase geprüft worden, aber auffallenderweise ohne Erfolg. Der gleiche Forscher hat aus dem Sinigrin ein sulfatfreies, bemerkenswertes Produkt erhalten, das er Merosinigrin nennt und folgendermassen formuliert (Chem. Ber. 47, 2226).

---

1) Tammann, H. 16, 271; 1892.

2) Fischer und Delbrück, Chem. Ber. 42, 1476; 1909.

3) W. Schneider und Clibben, Chem. Ber. 47, 2223; 1914.



Ohne Einwirkung ist Sinigrinase auf die von Schneider[1]) gewonnenen α- und β-Alkyl-Thioglukoside, z. B. Methylthioglukosid, $C_6H_{11}O_5 \cdot S \cdot CH_3$. Auch Emulsin bzw. Hefenenzyme vermögen nicht zu spalten.

Schliesslich haben Schneider und Wrede[2]) vergeblich versucht, ihre Thio-Isotrehalose durch Sinigrinase zu spalten, und auch hier zeigte weder Emulsin noch Hefenmaltase noch Trehalase eine Wirkung.

---

[1]) Schneider, Sepp, Stiehler, Chem. Ber. 51, 220; 1918.

[2]) Schneider und Wrede, Chem. Ber. 50, 793; 1917. — Siehe auch Wrede, H. 112, 1; 1920.

Kapitel 12.

Tannase.

Nach den eigentlichen Glukosidasen wird hier zum Schluss als besonderes Enzym die Tannase behandelt. Wie die in den vorhergehenden Kapiteln besprochenen Enzyme macht die Tannase zwar auch Glukose frei, aber die Reaktion ist eine andere insofern, als es sich hier im wesentlichen nicht um die Lösung einer Glukosidbindung[1]) handelt. Schon Fischer und Bergmann[2]) haben die Verschiedenheit von der Glukosidasespaltung in Betracht gezogen; sie schreiben: „Mancher wird geneigt sein, darin (in der Spaltung der 1-Galloylglukose) eine vollkommene Analogie mit der enzymatischen Spaltung der gewöhnlichen Glukoside zu sehen. Da aber das Emulsin ein Gemisch verschiedener Enzyme ist, so besteht noch die Möglichkeit, dass die Abspaltung des Galloyls von einem besonderen Enzym, etwa einer Esterase, bewirkt wird. Die Entscheidung der Frage, welches Enzym die Hydrolyse der l-Galloylglukose verursacht, erfordert eine besondere Untersuchung, die wir bisher nicht unternehmen konnten." Seitdem hat sich Freudenberg, dem man die wichtigsten Beiträge zur Kenntnis der Tannase verdankt, dahin entschieden, dass die Tannase gerade durch ihre Fähigkeit zur Esterspaltung charakterisiert ist[3]).

Andererseits liegen auch noch keine genügenden Anhaltspunkte dafür vor, dass das Enzym, welches Galloylglukose spaltet, den Lipasen so nahe verwandt ist, dass sie zu diesen gezählt werden müsste. Wie Freudenberg und Vollbrecht[4]) neuerdings hervorheben, sind die Tannasepräparate Enzymgemische, in welchen die Fähigkeit zur Spaltung des Rohrzuckers, der Cellobiose, Maltose, Stärke und des Inulins sowie eines Rhamnosids nachgewiesen werden konnte.

[1]) Über die Bezeichnung Glukosid siehe S. 233.

[2]) E. Fischer u. Bergmann, Chem. Ber. 51, 1760; 1918. — Fischer, Depside S. 349.

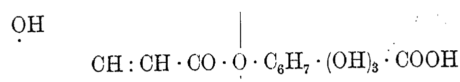
[3]) In Beziehung zur Tannase steht vielleicht die „Hadromase", welche u. a. auch Esterspaltende Komponenten zu enthalten scheint; Czapeks' Hadromal ist hypothetisch (vgl. S. 75); der enzymatische Abbau des Holzes verdient nähere Untersuchung.

[4]) Freudenberg u. Vollbrecht, H. 116, 277, 1921.

Ältere Arbeiten: 1786 hatte Scheele Gallussäure in Galläpfeln gefunden. Robiquet nahm 1837 an, dass die Zersetzung der Galläpfel durch ein in diesen enthaltenes Enzym bewirkt wird. Später hielt er[1]) das aus den Galläpfeln extrahierte Enzym Pektase für das Gallussäure abspaltende Agens. Den Nachweis, dass die Abspaltung der Gallussäure und Glukose (im wesentlichen) nicht durch ein Enzym der Galläpfel, sondern durch Pilze, und zwar durch den von ihm beschriebenen Aspergillus niger und durch Penicillium glaucum bewirkt wird, verdankt man van Tieghem[2]).

1901 extrahierten Fernbach[3]) und Pottevin[4]) Tannase aus Aspergillus; sie fanden diesen Pilz reich an Tannase, falls man in der Raulinschen Nährlösung den Zucker durch Tannin bzw. durch Gallussäure ersetzt.

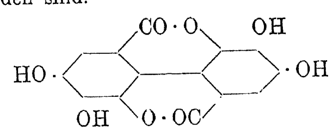
Substrat. Die hier in Betracht kommenden natürlichen Substrate hat Freudenberg[5]) als „hydrolysierbare Gerbstoffe" den „kondensierten" Gerbstoffen gegenübergestellt. Unter den hydrolysierbaren Gerbstoffen sind zu nennen das „türkische" (aus Quercus infectoria) und das „chinesische" Tannin, die Chebulinsäure, das Hamameli-Tannin und der gerbstoffartige Anteil der Kaffeebohnen, die Chlorogensäure[6]).



Kaffeesäure Chinasäure

Chlorogensäure

Übergänge zwischen den beiden Hauptgruppen der Gerbstoffe liegen vor im Eichen-Gerbstoff[7]), im Holzgerbstoff der Edelkastanie[8]) u. anderen, in welchen Gallussäure und besonders Ellagsäure mit kondensierten Systemen esterartig verbunden sind.



Ellagsäure.

Unter den synthetischen Substraten müssen als typisch hier genannt werden:

---

[1]) Robiquet, Ann. de Chim. et de Phys. (3) 39, 453; 1853.

[2]) van Tieghem, C. r. 65, 1091; 1867.

[3]) Fernbach, C. r. 131, 1214; 1901.

[4]) Pottevin, C. r. 131, 1215; 1901.

[5]) Siehe K. Freudenberg, Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe. Berlin, Springer 1920. Ferner Kollegium 1921, 11. — Zs angew. Chem. 34, 247; 1921. — Abderhaldens Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden S. 471.

[6]) Freudenberg, Chem. Ber. 53, 232; 1920.

[7]) Vollbrecht, Kollegium 1921, 394 u. 418.

[8]) Freudenberg u. Walpuski, Chem. Ber. 54, 1695; 1921.

Die 1-Galloyl-β-Glukose (= Glucogallin v. Gilson), Schmzp. 214—215° korr., $[\alpha]_D^{18} = -24{,}5$, für welche Fischer und Bergmann[1]) die Formel (I) aufgestellt haben. Ihr entspricht eine 1-Galloyl-α-Glukose.

(I)

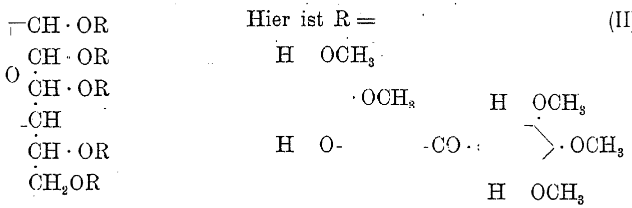
$CH \cdot O \cdot CO \cdot C_6H_2(OH)_3$
$CH \cdot OH$
$CH \cdot OH$
CH
$CH \cdot OH$
$CH_2 \cdot OH$

Die höheren Galloylglukosen bis zur Penta-Galloylglukose

$$[(HO)_3C_6H_2 \cdot CO]_5C_6H_7O_6,$$

besonders die Penta-(m-digalloyl)-β-glukose, sind interessant wegen ihrer nahen Beziehung zum chinesischen Tannin. Die Penta-[pentamethyl-m-digalloyl]-Glukose (II) ist nämlich dem von Herzig[2]) erhaltenen Methylotannin sehr ähnlich.

(II)

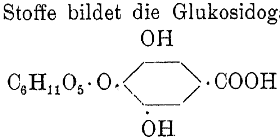


Besonders hervorzuheben sind auch die kristallisierten und infolgedessen gut definierten Gerbstoffe, und zwar ausser dem Hamameli-Tannin[3]), welches wahrscheinlich eine Digalloylhexose ist, noch die Digalloylglukose aus Chebulinsäure.

Der einfachste Vertreter der diesen Stoffen zugrunde liegenden Ester ist der schön kristallisierende Methylester der Gallussäure, welchen Freudenberg und Vollbrecht neuerdings zur quantitativen Bestimmung der Tannase angewandt haben (siehe S. 311 u. 313).

Eingehender und gesondert zu studieren wäre noch die enzymatische Spaltung der Estergruppierung in den Hexose-freien Didepsiden vom Typus der m-Digallussäure z. B. in der o-Diorsellinsäure[4]).

Schliesslich kommen die reinen Monogalloyl-Glukoside in Betracht. Den Grundtypus für diese Stoffe bildet die Glukosidogallussäure,



[1]) J. Fischer u. Bergmann, Chem. Ber. 51, 1760; 1918.
[2]) Herzig, Chem. Ber. 38, 989; 1905. — Monatsh. f. Chem. 30, 543; 1909.
[3]) K. Freudenberg, Chem. Ber. 52, 177; 1919.
[4]) E. Fischer und Hermann Fischer, Chem. Ber. 47, 505; 1914.

welche durch Emulsin gespalten wird[1]). Glukose findet sich in natürlichen Gerbstoffen auch in echter Glukosidbindung (z. B. im Eichengerbstoff)[2]).

Über die verschiedenen Tannine siehe Freudenbergs Monographie S. 78 u. ff. Besonders sei auch auf die beiden zusammenfassenden Abhandlungen von E. Fischer[3]) verwiesen.

Vorkommen. Wie schon erwähnt, wurde Tannase in Penicillium glaucum und besonders in Aspergillus niger gefunden. Natürlich sind dies nicht die einzigen Vertreter aus der grossen Familie der Aspergillaceen, in welchen sich die Fähigkeit zur Spaltung von Gallussäureestern findet oder hervorgerufen werden kann. Systematische Versuche fehlen noch. In höheren Pilzen scheint das Enzym seltener aufzutreten[4]).

Das auf Gerbstoffe eingestellte Enzym wird in den Aspergillaceen und demgemäss auch in ihren Extrakten von vielen anderen Enzymen begleitet; gerade die Schimmelpilze sind ausserordentlich reich an den verschiedensten Enzymen, wie z. B. aus den Arbeiten von A. W. Dox[5]) hervorgeht[6]). Deswegen ist auch die Unterscheidung und Trennung, die „biologische Reinigung", hier sehr schwer. Der chemischen Reaktion nach wäre das Enzym, welches z. B. Gallussäuremethylester spaltet, eine Esterase. Nun kommen in Schimmelpilzen Enzyme vor, welche sowohl Ester aliphatischer Fettsäuren als auch eigentliche Fette und Öle spalten. Man findet Angaben darüber z. B. bei Sigmund[7]), ferner bei Camus[8]) und Pottevin. Über die Spezifizität der Tannase, evtl. der Tannasen lässt sich also noch nichts sagen und ihr Wirkungsbereich muss erst festgestellt werden.

An der 1-Galloylglukose haben Fischer und Bergmann (Fischer, Depside, S. 388) den Einfluss einiger typischen Enzympräparate eingehend untersucht:

Emulsin wirkt wie bei den β-Glukosiden. Die durch die Spaltung frei werdende Gallussäure verzögert gegen Ende stark. Durch Kalziumkarbonat kann schädlicher Säureüberschuss vermieden werden, aber dadurch verändert sich die Drehung der Lösung schon ohne Enzym.

Phaseolunatase oder Linase (vgl. S. 251) aus Phaseolus-Bohnen erwies sich aktiv, ebenso Auszug aus untergäriger Hefe.

Lösung von 0,3325 g lufttrockener 1-Galloylglukose in 14 ccm Hefenauszug (geprüft gegen α-Methylglukosid) wurde mit 0,33 g $CaCO_3$ und Toluol unter Schütteln bei 34° aufbewahrt. Drehung (im 5 cm-Rohr) $-0,29°$, betrug nach 24 Stunden $-0,08°$ und nach 3 Tagen $+0,15°$. Aus der Lösung werden nun 0,090 g Gallussäure isoliert.

---

[1]) Fischer und Bergmann, Chem. Ber. 51, 1804; 1918.
[2]) Freudenberg, Privatmitteilung.
[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 46, 3253; 1913 und 52, 809; 1919.
[4]) Siehe z. B. Hasenöhrl und J. Zellner, Monatsh. 43, 21; 1922.
[5]) A. W. Dox, Bull. 110. B. An. Ind. U.S. Dept. Agric. 1910. — Jl Biol. Chem. 6, 461; 1909 u. a.
[6]) Siehe auch die Monographie von Wehmer in Lafars Handb. 2. Aufl. IV, 192.
[7]) Sigmund, Sitz.-Ber. Wien. Akad. d. W. 101, 549; 1892.
[8]) Camus, Soc. Biol. 49, 192; 1897. — Harriot u. Camus, C. r. 124, 235; 1897.

Die Wirkung der Hefe auf Tannin ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Biddle und Kelley[1]) haben in 4% Tanninlösung durch eine Reinkultur von Hefe Gärung hervorrufen können, indessen verschwanden die Gerbstoffreaktionen nicht. Man kann daraus schliessen, dass die Didepsidbindung durch Hefenenzyme nicht gelöst wird, wohl aber die Esterbindung zwischen Gallussäure und Zucker. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass Galloylglukose durch Emulsin (β-Glukosidase) gespalten wird, nachdem nachgewiesen ist, dass Kulturhefen β-Glukosidase enthalten. Es deutet auch darauf hin, dass die Esterbindung zwischen Zucker und (aromatischen) Karbonsäuren der β-Glukosidbindung zwischen Zucker und Phenolresten konstitutiv nahe steht.

Digalloylglukose wird dagegen, wie Freudenberg und Fick[2]) feststellten, weder von Emulsin, Phaseolunatase noch von Hefenauszug angegriffen. Die genannten Forscher schliessen daraus, dass keiner der beiden Gallussäurereste mit dem Zucker in derselben Beziehung steht, wie die Gallussäure in der 1-Galloyl-β-Glukose. „Vielleicht liegt ein Derivat der α-Glukose vor, wahrscheinlich aber ist die 1-Stellung des Zuckers unbesetzt. Vermutlich haftet an dieser Stelle die Spaltsäure."

Enzymbildung. Während es zweifelhaft ist, ob die künstliche Hervorrufung artfremder Enzyme in Mikroorganismen während kürzerer Perioden überhaupt schon gelungen ist, liegen zahlreiche Beobachtungen und eine Reihe von Untersuchungen vor, welche zeigen, dass viele niedere Organismen durch geeignete Züchtungs- und Ernährungsbedingungen zu gesteigerten Enzymwirkungen bzw. gesteigertem Enzymgehalt per Zelle gebracht werden können. Allerdings haben gerade die Versuche zur „Anpassung an Nährsubstrate" und also zur Bildung des dem ungewohnten Substrat entsprechenden Enzyms bei Hefen oft nicht zum erwarteten Resultat geführt, wie eine kritische Sichtung der Literatur zeigt. Bei den Aspergillaceen aber sind die starken Veränderungen, welche schon durch geringe — zuweilen minimale — Variationen der Nährlösung eintreten, sehr auffallend.

Als festgestellt kann die schon von Fernbach und von Pottevin beobachtete Tatsache betrachtet werden, dass die Fähigkeit von Aspergillus niger zur Tanninspaltung dadurch steigt, dass dieser Pilz auf Nährlösungen gezüchtet wird, welchen Tannin (oder ähnliche Gerbstoffe, oder auch Derivate der Gallussäure an Stelle von Kohlehydraten) zugesetzt worden sind. Gleichzeitig nimmt das Wachstum des Pilzes zu, und auch der Gehalt an gewissen anderen Enzymen, welcher übrigens bei weitem nicht so konstant ist wie bei der Hefe[3]), steigt.

Welche Mengen zu diesem Zweck einer Nährlösung, z. B. Czapeks, zugesetzt werden dürfen, ohne dass die Steigerung in eine Hemmung der

[1]) Biddle und Kelley, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 919; 1912.
[2]) Freudenberg u. Fick, Chem. Ber. 53, 1728, 1920.
[3]) Euler, Fermentf. 4, 242; 1921.

Tannasebildung und des Zuwachses übergeht, ist eine Frage, die nicht ohne praktisches Interesse ist. Lewis Knudson[1]), der daraufhin eine Anzahl von Aspergillaceen und Mucoraceen untersucht hat, kommt zum Resultat, dass Aspergillus niger, Aspergillus flavus und Penicillium sp. Tanninzusätze am besten vertragen. Aspergillus produziert mehr Tannase als Penicillium.

In einer Nährlösung, welche als Kohlenstoffquelle 2 % Tannin enthält, erniedrigt nach Knudson ein Rohrzuckerzusatz die Abscheidung der Tannase. „Tannin ist als Stimulans für Tannasebildung wirksamer als Gallussäure. In einer Nährlösung, welche 10 % Zucker enthält, nimmt die Tannasebildung mit der Konzentration der Gallussäure zu."

Freudenberg und Vollbrecht (l. c.) haben ihren Nährlösungen statt Tannin die billigeren Myrobalanen zugesetzt. Sie geben folgende Vorschrift:

600 g grob gemahlene Myrobalanen werden in 3 l Leitungswasser 10 Minuten gekocht, danach wird abgegossen und der Rückstand 3—4 mal mit je 2 l heiss ausgezogen. Die Flüssigkeit wird mit der Lösung von 300 g Ammoniumsulfat, 9 g Dikaliumphosphat und 3 g Magnesiumsulfat versetzt und auf 12 Liter aufgefüllt. Mit der Lösung werden flache Schalen derart angefüllt, dass die Schichtdicke mindestens 4 cm beträgt. Auf dünnerer Schicht wächst der Pilz schlecht. Nach dem Animpfen mit Aspergillus niger bleibt die Flüssigkeit leicht bedeckt im Dunkeln bei 28—32° stehen. Nach etwa 4 Tagen wird der mit einem Anflug von Sporen überzogene Pilz abgehoben, mit 6 mal erneuertem Wasser durchgeknetet und jedesmal mit der Hand ausgepresst. Diese Massnahme erleichtert die spätere Filtration.

Darstellung. „Der feuchte Pilz wird mit 1 Liter Wasser und 1 ccm Toluol zu einem dünnen Brei angerieben und 24 Stunden unter häufigem Umrühren bei 20° sich selbst überlassen. Während der ersten 8—10 Stunden tritt Säure aus; sie wird alle 2—3 Stunden mit kalt gesättigter Bariumhydroxydlösung (insgesamt etwa 10 ccm) vorsichtig abgestumpft. Durch diese Massnahme, die der Maltasebereitung (Neutralisationsverfahren) von Willstätter, Oppenheimer und Steibelt (vergl. S. 154) nachgebildet ist, erhöht sich die Ausbeute an Tannase auf das Vielfache. Nun wird durch eine Lage Kieselgur abgesaugt und gewaschen. Das Mycel wird erneut mit 1/2 Liter Wasser und 1/2 ccm Toluol angerührt und nach 2 Stunden abfiltriert. Die vereinigten Auszüge werden im Vakuum auf 50—60 ccm eingeengt, durch Kieselgur geklärt und mit dem 5fachen Volum absoluten Alkohols versetzt. Die Tannase fällt in hellen Flocken, die sich nach einigem Schütteln filtrieren lassen. Das Präparat wird noch 2 mal in 20—30 ccm Wasser gelöst und mit dem 5 fachen Volum absoluten Alkohols gefällt. Zuletzt wird mit Alkohol, dann mit Äther nachgewaschen und im Exsikkator getrocknet. Falls das hellgraue Pulver Fehlingsche Lösung reduziert, muss es nochmals umgefällt werden. Ausbeute 2,5—3,5 g vom Spaltwert 35."

[1]) Lewis Knudson, Jl Biol. Chem. 14, 159; 1913.

Wirkungsbedingungen. Da bei der Spaltung des Gallussäuremethylesters die Gegenwart von Puffern die Schärfe der Titration herabsetzt, haben Freudenberg und Vollbrecht solche Mittel nicht verwendet und dadurch auch das Aziditätsoptimum noch nicht genau festgelegt. Jedenfalls ist die Tannase in saurer Lösung noch wirksam, wird aber durch grossen Säureüberschuss gehemmt. Die der Tannase beigemengten Salze beeinflussen den Gang des Abbaus nicht.

Bei der Zuckerabspaltung aus Gerbstoffen ist zu beachten, dass Tannin die Wirkung der β-Glukosidase nicht unerheblich hemmt.

Kinetik.

Da Freudenberg die Wirksamkeitsbestimmung der Tannase auf die Spaltung des Gallussäuremethylesters — eines in mancher Hinsicht zweifellos sehr geeigneten Substrates — gründen will, hat er mit Vollbrecht zunächst den Verlauf der Hydrolyse dieses Esters und des Tannins verglichen.

Die folgende Tabelle bezieht sich auf 1,000 g Tannin, 1,082 g Gallussäuremethylester und 1,423 g Digalloylglukose. Diese Stoffe wurden wasserfrei gewogen und in 300 ccm Wasser gelöst; jede Lösung gibt nach beendetem Abbau $^1/_3$ % Gallussäure, eine Konzentration, die sich früher bewährt hatte. Titration in 20 ccm. Toluolzusatz. Temp. 30°. Gleiche Enzymmengen.

Abbau in %.

Stunden	10	24	48	72	168
Digalloylglukose .	19,2	29,9	40,0	48,5	74,0
Ester.	13,1	20,5	29,9	37,4	64,5
Chin. Tannin . . .	8,0	11,0	13,5	23,7	81,0

Wie man sieht, ist die Grössenordnung der Spaltung bei allen 3 Substraten die gleiche. Was den Verlauf betrifft, so liegt die Wirkung auf den Gallussäuremethylester bis zu etwa 50% Spaltung zwischen der Wirkung auf Tannin und auf Digalloylglukose. Bei anderen Tannasepräparaten und bei 40° wurden die gleichen Verhältnisse gefunden. Beeinflusst wird der Verlauf natürlich dadurch, dass die Azidität der Lösung mit der Zeit steigt.

Über den Einfluss der Konzentration wurden zwei Versuchsreihen mit verschiedenen Enzympräparaten angestellt, wobei Esterlösungen von $^1/_3$, $^1/_2$, 1 und 2 Gallussäureprozenten mit so viel Tannase angesetzt wurden, dass stets die gleiche Menge Enzym auf 1,082 g Ester kam.

„Die Geschwindigkeit steigt mit der Verdünnung und erreicht bei $^1/_2$% den Höhepunkt.“ Weitere Verdünnung wirkt nicht beschleunigend, sondern eher verzögernd auf den Abbau.

Beziehung zwischen Enzymmenge und Umsatz.

„Der Abbau folgt nicht dem Gang der monomolaren Reaktion; selbst die Beziehung der umgekehrten Proportionalität zwischen Enzymmenge und Zeiten gleichen Umsatzes ist nur angenähert vorhanden, und auch das nur in dem eng umgrenzten Bereich von 1 : 10 Teilen Tannase bei einer Reaktionsdauer unter 120 Stunden und einer Spaltung von 30—70 %. Nur bei kürzerer Einwirkung können Spaltungen unter 30 % einbezogen werden."

„Da also keine strenge Proportionalität vorliegt, oder mit anderen Worten, das Produkt aus Enzymmenge und Zeiten gleichen Umsatzes nicht genügend gleich bleibt, muss die Zeit als Variable ausgeschaltet werden." Dies tut Freudenberg durch die Aufstellung einer „24-Stunden-Kurve". Der Umsatz, den verschiedene Mengen ein- und desselben Tannasepräparates in 24 Stunden bewirken, wird auf die Ordinate aufgetragen, die Menge auf die Abszisse.

Tannasemenge		0,01	0,014	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,10
Präp. I	Abbau %	20,5	27,3	34,9	46,2	53,4	59,5	64,7	69,0	72,7	80,0
Präp. II		10,3			25,2	31,5	35,8				53,5

Soll Präparat II mit I verglichen werden, so braucht nur der Umsatz einer beliebigen Menge von II bei 33°. in 24 Stunden festgestellt und auf der Kurve I aufgesucht zu werden. Alsdann kann man unmittelbar ablesen, welche Menge des Präparates I der angewandten von II entspricht.

Methode zur Bestimmung der Tannase[1]).

Fischer hat den Verlauf der Tannase-Spaltung der 1-Galloyl-Glukose polarimetrisch verfolgt, dann hat Freudenberg die Spaltung des Hamameli-Tannins und der Digalloylglukose aus Chebulinsäure studiert. Diese Stoffe sind schwer zugänglich und schwer löslich. Auch entstehen theoretische Schwierigkeiten bei diesen Gerbstoffen dadurch, dass der Abbau über Monogalloylhexosen von unbekannten Drehungswerten hinwegführt. Zunächst den genannten Gerbstoffen kommen die Galläpfeltannine in Frage. Sie sind zwar zugänglich und löslich, aber die Lösungen trüben und färben sich oft beim Abbau, ausserdem sind sie amorph und weisen kein gleichmässiges Drehungsvermögen auf.

Eine bessere Handhabe fand Freudenberg im Anstieg des Säuretiters; er hebt aber hervor, dass dieses Verfahren den Nachteil hat, dass weder bei der günstigsten noch überhaupt bei gleichbleibender Wasserstoffionenkonzentration gearbeitet werden konnte.

[1]) Qualitativ lässt sich die Hydrolyse der Tannine durch Vermischen mit 1%iger Gelatinelösung verfolgen.

t lässt sich diese offenbar zweckmässige Methode in der Weise anwenden, in welcher E. Knaffl-Lenz im hiesigen Laboratorium die enzymatische Spaltung von Estern wie Aethyl-Butyrat u. a. verfolgt hat, indem aus Mikrobüretten in kurzen Abständen so viel Alkali zugesetzt wird, dass die mit einem geeigneten Indikator, dessen Umschlagspunkt dem optimalen pH entspricht, versehene Lösung ständig auf dem Umschlagspunkt des Indikators gehalten wird.

Bestimmung der Wirksamkeit der Tannase; Spaltwert.

Freudenberg definiert den Spaltwert eines Tannasepräparates durch die Anzahl Milligramme, die nötig sind, um bei 33° in 24 Stunden 1,082 g wasserfreien Gallussäuremethylesters (entsprechend 1,000 g Gallussäure), in 200 ccm Wasser gelöst, zur Hälfte zu spalten. Die Präparate, deren Wirkung in der Figur 44 dargestellt ist, haben die Spaltwerte 35,4 und 86.

„Zur Bestimmung des Spaltwertes an einem Präparate unbekannter Stärke wird eine Probe von 50 ccm in der vorgeschriebenen Weise angesetzt (zwei Titrationen). Liegt die gefundene Spaltung zwischen 20 und 65 %, so lässt sich der Spaltwert aus der Kurve I (Fig. 44) ablesen. Liegt das erste Spaltergebnis ausserhalb des angegebenen Bereichs, so ist der Versuch mit entsprechend veränderter Tannasemenge zu wiederholen. Die Bestimmung wird in den meisten Fällen genau genug sein. Es gelingt jedoch leicht, den zweiten Versuch in die Nähe von 50 % Spaltung zu führen und alsdann einen dritten so anzusetzen, dass er hart an 50 % trifft, und mit dem zweiten Versuche den Wert 50 einrahmt. Dann ist der Spaltwert unabhängig von der Kurve I ermittelt.“

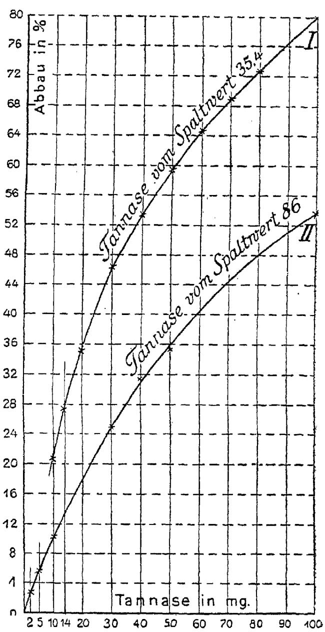


Fig. 44.

Technische Anwendungen der enzymatischen Gerbstoffspaltung.

Zur Darstellung von Gallussäure hat Calmette[1]) ein Verfahren beschrieben, nach welchem man Tannin-haltige Lösungen (Galläpfelextrakte) mit einer Aspergillusrasse „Aspergillus gallomyces“ impft und steril so lüftet, dass der Pilz innerhalb der Flüssigkeit wächst. Wie schon van Tieghem

gefunden hatte, ist Aspergillus enzymatisch gegenüber Tannin viel wirksamer wenn sich das Mycel nicht auf der Oberfläche der Nährlösung, sondern in Innern derselben entwickelt hat.

Nach Ullmann[1]) werden zur Fabrikation von Gallussäure 100 kg grob zerquetschte Gallen in auszementierten Gruben mit 10 Liter Wasse angefeuchtet, in dem man 1 kg gewöhnliche Bäckerhefe aufgeschlämmt hat Nach kurzer Zeit tritt Gärung ein; die Gärtemperatur soll 38° nicht überschreiten. Aus dem vergorenen Brei wird die Gallussäure mit Äther-Alkoho ausgeschüttelt.

---

[1]) Ullmann, Enzykl. d. techn. Chem. 5, 617; 1917.